

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIANE SILVA BELTRAMI DE CASTRO

ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS BASEADAS NO EMPREGO DA EXTRAÇÃO  
EM FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA  
DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS NATURAIS

CURITIBA

2016

FRANCIANE SILVA BELTRAMIN DE CASTRO

ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS BASEADAS NO EMPREGO DA EXTRAÇÃO EM  
FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE  
CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS NATURAIS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de mestre em Química  
Analítica, no curso de Pós-Graduação em  
Química, Setor de Ciências Exatas, da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

Coorientador: Prof. Dr. Bruno J. Gonçalves da Silva

Curitiba

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS BASEADAS NO EMPREGO DA  
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO  
CROMATOGRÁFICA DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM  
ÁGUAS NATURAIS**

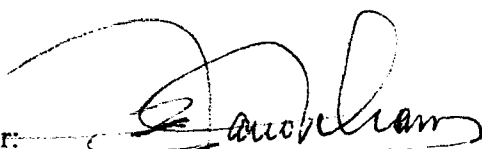
por

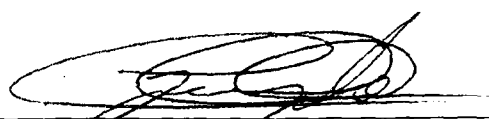
**FRANCIANE SILVA BELTRAMIN DE CASTRO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:   
Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi  
Dep. de Química – UFPR

  
Prof. Dr. Júlio César Rodrigues de Azevedo  
Dep. Acadêmico de Química e Biologia – UTFPR

  
Prof.ª Dr.ª Andrea Pinto de Oliveira  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de junho de 2016.

Dedico esse trabalho ao meu pai e à minha mãe que sempre me incentivaram, me mostraram o melhor caminho e acreditaram em meu potencial.

Dedico também ao meu esposo, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos mais difíceis.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por proporcionar oportunidades únicas e estar sempre me guiando e me dando forças para seguir;

À minha mãe Rosangela e ao meu pai Almeri, que sempre me deram amor, carinho, incentivo e se dedicaram ao máximo para que eu chegasse até aqui, mostrando que sempre estão ao meu lado, independente do que aconteça;

À minha irmã Fabiele e à minha cunhada Fhairus, pela amizade, companheirismo e compreensão;

Ao meu esposo Leandro, que sempre acreditou que eu posso ir além, me apoiando e ajudando o máximo possível em todas as situações e por todo amor e felicidade proporcionados;

Às minhas amigas e aos meus amigos, pelo amor, companheirismo, apoio e conversas, risadas e puxões de orelha, que fazem a vida ser muito mais bonita e me ajudam nas decisões mais importantes, em especial à Gislaine, minha amiga-irmã de todas as horas e à Simone, por todas as dicas, conselhos e cafés.

À todos os colegas do GQA que me ajudaram nos experimentos, por toda a paciência;

Ao meu orientador professor Dr. Marco T Grassi, por aceitar a minha entrada no grupo de pesquisa e por toda ajuda e dedicação;

Ao meu coorientador, professor Dr. Bruno J. Gonçalves da Silva, por me mostrar o melhor caminho a seguir com minha pesquisa e me dar dicas importantes;

Ao professor Patrício G. Peralta-Zamora, por autorizar a utilização do equipamento de HPLC-DAD;

À professora Dra. Jaísa F. Soares, professora responsável pelo laboratório que eu trabalho, por permitir realizar esse sonho, e por todo apoio durante esses dois anos;

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade;

## RESUMO

A quantidade de contaminantes em águas superficiais e subterrâneas têm aumentado muito nas últimas décadas. Dentre os contaminantes que podem estar presentes na água estão os contaminantes emergentes, que são substâncias não legisladas que estão presentes em vários produtos utilizados pelo homem, como bactericidas, medicamentos, hormônios e pesticidas. Esses contaminantes aportam nas águas principalmente pelo descarte de efluentes domésticos e industriais e podem causar muitos malefícios aos animais, incluindo os seres humanos. Essas substâncias estão presentes na água em níveis muito baixos ( $\mu\text{g}$  ou  $\text{mg L}^{-1}$ ) e a água é uma matriz complexa, por isso o preparo da amostra, que envolve as etapas de extração, *clean up* e concentração é fundamental. Existem vários métodos utilizados para extração de contaminantes emergentes em águas superficiais, um deles é a extração em fase sólida (SPE). Nesse tipo de extração podem ser utilizadas várias fases extratoras para a retenção dos analitos. Nesse estudo, duas fases extratoras comerciais de SPE (octadecilsilano e uma polimerizada) foram comparadas para verificar qual possui mais eficiência para extrair atrazina (herbicida), cafeína, progesterona (hormônio feminino) e triclosan (bactericida) das águas de três rios de Curitiba e Região Metropolitana, sendo rio Iguaçu, rio Belém e rio Iraí e em água de abastecimento público, sendo feitas as análises por cromatografia de fase líquida de alta eficiência (HPLC), sendo necessário também propor um método de análise pelo referido equipamento. Foi proposto um método de análise com boas exatidão, precisão e linearidade. A fase extratora que gerou melhores resultados de recuperação foi a de octadecilsilano quimicamente ligado à sílica (C18). Foram encontrados cafeína, progesterona e triclosan na água do rio Belém, progesterona na água do rio Iguaçu e não foi encontrado nenhum dos quatro contaminantes nas águas do rio Iraí e de abastecimento público.

Palavras chave: Contaminantes emergentes, SPE, HPLC-DAD.

## ABSTRACT

The amount of contaminants in surface and ground waters have increased greatly in recent decades. Among the contaminants that may be present in the emerging water are contaminants that are not legislated substances, which are present in various products used by humans as bactericides, drugs, hormones and pesticides. These contaminants points in the waters mainly by the disposal of domestic and industrial effluents and can cause a lot of harm to animals, including humans. These substances are present in water in very low levels ( $\mu\text{g}$  or  $\text{mg L}^{-1}$ ) and water is a complex matrix, so the sample preparation involving the steps of extraction, clean up and concentration is fundamental. There are several methods for the extraction of emerging contaminants in surface water, one of them is the solid phase extraction (SPE). In this type of extraction may be repeated several extracting phases for the retention of analytes. In this study, two commercial extractors phase SPE (octadecylsilane and polymerized) were compared to see which is more efficient to extract atrazine (herbicide), caffeine, progesterone (female hormone) and triclosan (bactericidal) the waters of three rivers of Curitiba and metropolitan area, as Iguazu River, Belem River and Irai River and in the public water supply, which made the analysis by liquid phase chromatography high performance (HPLC), and must also propose a method of analysis by that equipment. It has been proposed a method of analysis with best recovery's results was the recovery of chemically bound to sílica octadecylsilane (C18). Caffeine has been found, progesterone and triclosan in the Rio Belem water, progesterone in the Iguazu River water and has not found any of the four contaminants in the Irai River or in public supply.

Keywords: Emerging Contaminants, SPE, HPLC-DAD.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> POSSÍVEIS VIAS DE TRANSPORTE DOS CONTAMINANTES EMERGENTES DE USO DOMÉSTICO PARA AS ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO .....	12
<b>FIGURA 2.</b> POSSÍVEIS VIAS DE TRANSPORTE DOS PESTICIDAS PARA AS ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO .....	13
<b>FIGURA 3.</b> FÓRMULA ESTRUTURAL DA ATRAZINA .....	16
<b>FIGURA 4.</b> FÓRMULA ESTRUTURAL DA CAFEÍNA .....	17
<b>FIGURA 5.</b> FÓRMULA ESTRUTURAL DA PROGESTERONA .....	18
<b>FIGURA 6.</b> FÓRMULA ESTRUTURAL DO TRICLOSAN .....	19
<b>FIGURA 7.</b> ETAPAS DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA .....	22
<b>FIGURA 8.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DA FASE EXTRATORA C18 .....	23
<b>FIGURA 9.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DA FASE EXTRATORA HLB .....	24
<b>FIGURA 10.</b> ESQUEMA DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO DA CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) .....	24
<b>FIGURA 11.</b> ESQUEMA DE UM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (DAD) .....	28
<b>FIGURA 12.</b> PROCESSO DE ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO PELA AMOSTRA E O RESULTADO DA ANÁLISE POR UV-VIS .....	29
<b>FIGURA 13.</b> SISTEMA PARA A EXECUÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA .....	40
<b>FIGURA 14.</b> FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO .....	41
<b>FIGURA 15.</b> ÍNDICE DE CHUVA ACUMULADA NO MÊS DE ABRIL/2016 ...	43
<b>FIGURA 16.</b> ÍNDICE DE CHUVA ACUMULADA NO MÊS DE JULHO/2016 ..	43



<b>FIGURA 17. LOCALIZAÇÃO DAS COLETAS DE AMOSTRA EM CADA UM DOS RIOS .....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 18. LOCAIS DAS COLETAS DE AMOSTRAS .....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 19. ESPECTRO UV-VIS OBTIDO PARA A ATRAZINA .....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 20. ESPECTRO UV-VIS OBTIDO PARA A CAFEÍNA .....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 21. ESPECTRO UV-VIS OBTIDO PARA A PROGESTERONA .....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 22. ESPECTRO UV-VIS OBTIDO PARA O TRICLOSAN .....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 23. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES OBTIDO NOS TESTES PRELIMINARES .....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 24. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES OBTIDO NA FASE DE TESTES .....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 25. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 26. GRÁFICO COM AS PROPORÇÕES DE FASE MÓVEL DA CORRIDA CROMATOGRÁFICA .....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 27. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES OBTIDO COM TEMPERATURA DA COLUNA EM 21° C .....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 28. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES OBTIDO COM TEMPERATURA DA COLUNA EM 30° C .....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 29. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES OBTIDO COM VAZÃO DE FASE MÓVEL A 0,8 ML MIN<sup>-1</sup> .....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 30. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES OBTIDO COM VAZÃO DE FASE MÓVEL A 1,2 ML MIN<sup>-1</sup> .....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 31. CURVA ANALÍTICA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ATRAZINA ..</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 32. CURVA ANALÍTICA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CAFEÍNA .....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 33. CURVA ANALÍTICA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE PROGESTERONA .....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 34. CURVA ANALÍTICA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TRICLOSAN</b>	<b>61</b>

<b>FIGURA 35.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA TESTE DE EXTRAÇÃO COM CARTUCHO C18 .....	64
<b>FIGURA 36.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA TESTE DE EXTRAÇÃO COM CARTUCHO HLB .....	66
<b>FIGURA 37.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O BRANCO .....	69
<b>FIGURA 38.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO .....	70
<b>FIGURA 39.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O BRANCO .....	71
<b>FIGURA 40.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A ÁGUA DO RIO IRAÍ .....	72
<b>FIGURA 41.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A LAGOA DO PARQUE NÁUTICO EM 240 nm .....	73
<b>FIGURA 42.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A LAGOA DO PARQUE NÁUTICO EM 272 nm .....	74
<b>FIGURA 43.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O RIO BELÉM EM 240 nm	75
<b>FIGURA 44.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O RIO BELÉM EM 272 nm	76
<b>FIGURA 45.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O RIO IGUAÇÚ EM 240 nm .....	77
<b>FIGURA 46.</b> CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O RIO IGUAÇÚ EM 272 nm .....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS A SEREM DETERMINADOS NESSE TRABALHO .....</b>	<b>21</b>
<b>TABELA 2. IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS DOS RIOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA .....</b>	<b>42</b>
<b>TABELA 3. COMPRIMENTOS DE ONDA DE ABSORÇÃO DOS ANALITOS</b>	<b>51</b>
<b>TABELA 4. FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NA CURVA ....</b>	<b>59</b>
<b>TABELA 5. PARÂMETROS DE MÉRITO OBTIDOS ATRAVÉS DAS CURVAS ANALÍTICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>TABELA 6. ERROS RELATIVOS OBTIDOS PARA OS ANALITOS .....</b>	<b>72</b>
<b>TABELA 7. COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS ANALITOS .....</b>	<b>73</b>
<b>TABELA 8. RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDOS COM CARTUCHO C18 .....</b>	<b>75</b>
<b>TABELA 9. RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDOS COM CARTUCHO C18 .....</b>	<b>75</b>
<b>TABELA 10. RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDOS COM CARTUCHO HLB .....</b>	<b>77</b>
<b>TABELA 11. RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDOS COM CARTUCHO HLB .....</b>	<b>77</b>
<b>TABELA 12. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO APÓS A EXTRAÇÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>TABELA 13. RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS .....</b>	<b>79</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 ANALITOS	15
1.1.1 ATRAZINA	15
1.1.2 CAFEÍNA	16
1.1.3 PROGESTERONA	18
1.1.4 TRICLOSAN	19
1.2 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS ANALITOS	20
1.3 PREPARO DA AMOSTRA	21
1.4 FILTRAÇÃO	24
1.5 DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUA	25
1.5.1 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (HPLC-DAD)	26
1.5.2 DETECTORES	27
1.6 ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS	28
1.6.1 LEI DE LAMBERT-BEER	29
1.7 PARÂMETROS DE MÉRITO	30
1.7.1 LIMITE DE DETECÇÃO	30
1.7.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	30
1.7.3 PRECISÃO	30
1.7.4 EXATIDÃO	31
1.7.5 SELETIVIDADE	31
1.7.6 LINEARIDADE	31
1.7.7 ROBUSTEZ	31
1.8 AMOSTRAGEM	32
1.9 JUSTIFICATIVA	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35

3.1 REAGENTES .....	35
3.2 LIMPEZA DE VIDRARIAS E MATERIAIS .....	35
3.3 PREPARO DE AMOSTRAS .....	36
3.4 ESPECTROS UV-VIS .....	37
3.5 MÉTODO DO HPLC .....	37
3.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	38
3.7 OTIMIZAÇÃO DOS TESTES PARA A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) .....	39
3.8 AMOSTRAGEM .....	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1 ESPECTROS UV-VIS .....	48
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	51
4.3 CURVA ANALÍTICA .....	59
4.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) .....	64
4.5 ANÁLISE DAS ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO E DE RIOS .....	68
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A quantidade de substâncias químicas sintetizadas e comercializadas tem crescido constantemente e muitos contaminantes têm sido introduzidos no meio ambiente, incluindo as águas superficiais, subterrâneas e oceânicas por meio de atividades diretas e indiretas do homem, como o descarte de efluentes domésticos e industriais, o uso de diversos produtos químicos na agricultura e a urbanização. Mais de 80 mil substâncias químicas sintéticas têm sido descartadas por ano no meio ambiente (Kibena, Nhapi, & Gumindoga, 2013; Robles-Molina et al 2014; Naidu, Andres, Espana, Liu, & Jit, 2016).

A contaminação das águas pode causar toxicidade aguda e crônica em animais aquáticos, alterar a biodiversidade marinha e causar efeitos adversos nos seres humanos e outros animais (Loos, Tavazzi, Paracchini, Canuti, & Weissteiner, 2013).

Segundo a ONU (Organização das Nações Unidas), em 2002, 5 milhões de pessoas morriam por ano por doenças relacionadas com a poluição da água, esse número foi dez vezes maior que o número de pessoas que morriam por ano na segunda guerra mundial (Azizullah, Khattak K.N. Muhammad, Richter Peter, 2011).

No Brasil, em 2013, apenas 56% do esgoto urbano era coletado, desses, apenas 69% era tratado (SNIS- Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento). Em Curitiba, segundo a Companhia Paranaense de Saneamento (SANEPAR), no ano de 2013, 98% das residências tinham acesso à rede de coleta de esgoto, mas apenas 65% estavam interligadas ao sistema. A ineficiência do tratamento de esgoto faz com que esses contaminantes sejam encontrados em rios e também podem ser encontrados em águas de abastecimento público, já que esses contaminantes são resistentes também ao tratamento da água (Montagner & Jardim, 2011).

Algumas agências regulatórias, como a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) e a Comissão Europeia sobre Meio Ambiente estão tentando estabelecer limites de uso e procedimentos de caracterização para as substâncias que são tóxicas ao meio ambiente e aos seres humanos. Uma das

classes desses poluentes são os contaminantes emergentes (Grazieli & Collins, 2011), que são substâncias ainda não contempladas em legislações ambientais tanto no Brasil quanto em diversos países do mundo. Alguns compostos isolados vêm sendo regulamentados, embora a grande maioria ainda permaneça sem definições legais quanto à presença e concentração em diferentes matrizes (Maia & Dezotti, 2007).

Atualmente, há uma grande preocupação da comunidade científica com esses contaminantes, que podem pertencer a diversas classes de substâncias químicas e serem encontradas em produtos tais como: fármacos, hormônios, pesticidas, produtos de higiene pessoal, drogas ilícitas, entre outros. Apesar de serem encontrados em níveis traços ( $\text{mg L}^{-1}$ ) a ultra-traços ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em matrizes de interesse ambiental, tais como águas naturais e destinadas ao abastecimento público, causam deterioração da qualidade da água e podem acarretar alterações fisiológicas nos seres humanos e nos outros animais, afetando a saúde, o crescimento e a reprodução dos mesmos, ainda que alguns não sejam persistentes no meio ambiente. Alguns estudos mostram que a exposição à esses contaminantes podem estar associada à maior incidência de câncer de mama, da diminuição da qualidade do sêmen e da antecipação da menarca (Montagner & Jardim, 2011; Maldaner & Jardim, 2012; Sodré, Antonio, Locatelli, & Jardim, 2010; Peysson & Vulliet, 2013; Aguirre-Martínez, DelValls, & Laura Martín-Díaz, 2015; Hurtado-sánchez, Lozano, Rodríguez, Durán-merás, & Escandar, 2015).

A progesterona, assim como outros hormônios, a atrazina e o triclosan estão inseridos na classe de compostos desreguladores endócrinos, por causarem malefícios ao sistema endócrino de humanos e outros animais, podendo alterar a função de um órgão endócrino ou alterar o metabolismo de um hormônio de um órgão endócrino, como por exemplo, diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, problemas no sistema reprodutivo e feminização de peixes, alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos e até declínio da população. Alguns estudos mostram que os efeitos em humanos podem estar associados a redução da quantidade de esperma, aumento da incidência de câncer de mama, testículos e próstata e aumento dos casos de endometriose. Inicialmente, haviam 66 compostos listados pela UE-

Strategy for Endocrine Disrupters *Committee* como desreguladores endócrinos e atualmente são 564. A preocupação com relação a esses contaminantes é que como eles não são legislados, não se sabe em quais concentrações podem ser tóxicos, se existem concentrações seguras para essas substâncias e quais experimentos devem ser realizados para monitorar esses efeitos no meio ambiente (Naidu et al., 2016; Maia & Dezotti, 2007). As disfunções endócrinas causadas por essas substâncias vêm sendo estudadas como prioridade em agências regulatórias (Fayad, Prévost & Sauvé, 2013).

Nas figuras 1 e 2, estão representados fluxogramas que mostram as possíveis vias de transporte dos contaminantes emergentes até as águas de abastecimento público.

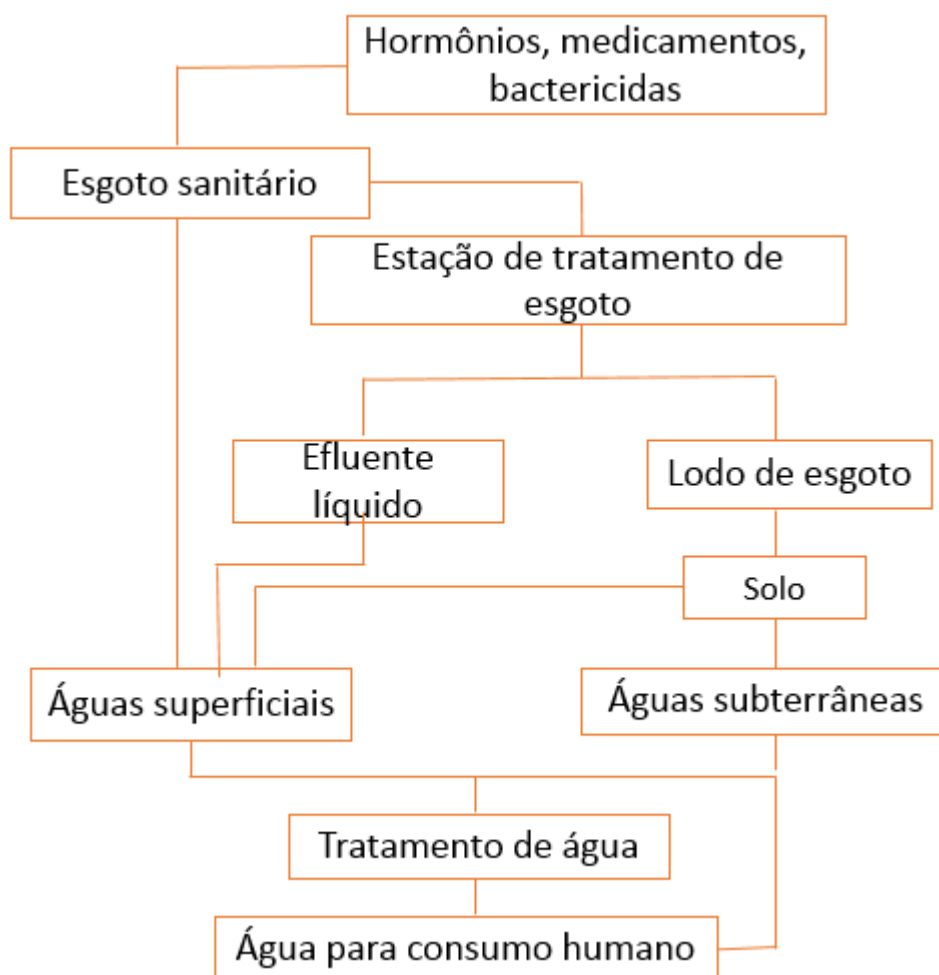


Figura 1: Possíveis vias de transporte dos contaminantes emergentes de uso doméstico até as águas de abastecimento público.



Os contaminantes emergentes podem chegar às águas de abastecimento público através de possíveis vias de transporte representadas no fluxograma. Esses contaminantes são excretados diretamente no esgoto sanitário. O esgoto sanitário pode ser descartado diretamente nas águas superficiais ou passar pela estação de tratamento de esgoto. Quando passa pela estação de tratamento de esgoto, a parte tratada, que é o efluente líquido, é jogado diretamente nos rios. A parte residual do tratamento é o lodo de esgoto, muito utilizado como fertilizante na agricultura, indo assim para o solo. Do solo, os contaminantes podem ser lixiviados para as águas subterrâneas ou através da precipitação pluviométrica, chegar nas águas superficiais. As águas superficiais e subterrâneas geralmente passam pelo tratamento de água antes de serem distribuídas, mas na maioria dos casos, o tratamento de água não é eficiente para remover esses contaminantes.

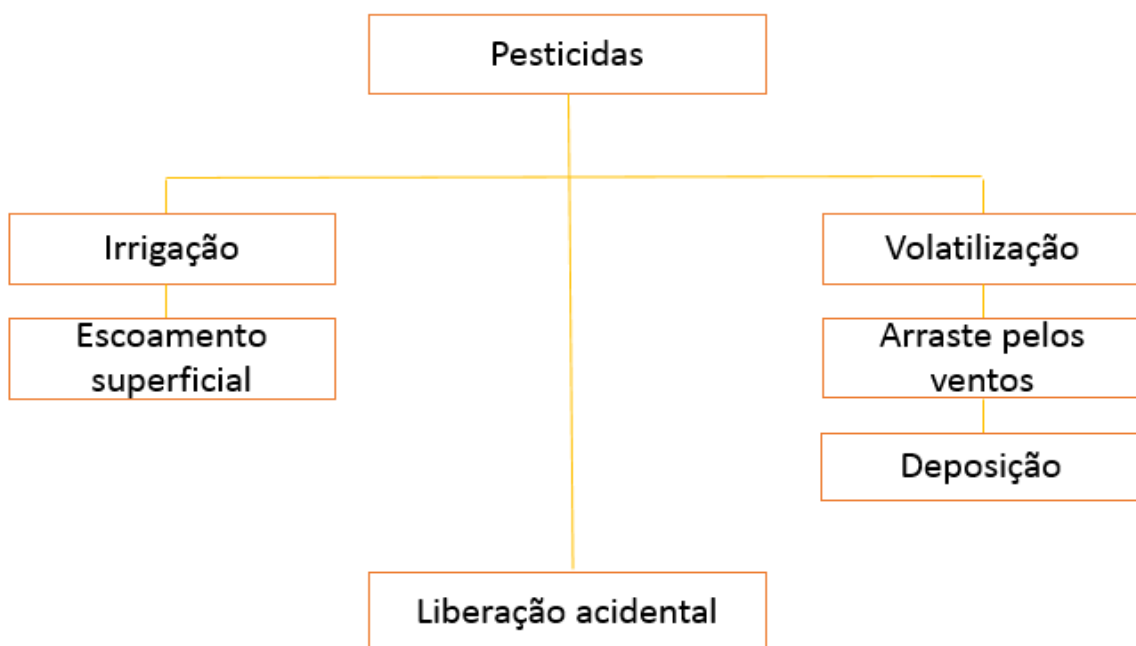


Figura 2: Vias de transporte dos pesticidas até as águas de abastecimento público.

Os pesticidas podem chegar às águas de abastecimento público através de três vias principais: quando há irrigação ou precipitação pluviométrica podem chegar às águas através do escoamento superficial, os pesticidas podem se volatilizar e serem arrastados pelo vento, depositando-se nas águas ou também por liberação acidental, que pode ocorrer dentro do pátio de aplicação dos

pesticidas, por mau uso dos equipamentos ou acidentes como furos na embalagem.

Vários estudos têm sido feitos ao redor do mundo para o monitoramento de contaminantes emergentes, pois apesar de causarem todos os problemas citados anteriormente, muitas dessas substâncias e seus metabólitos já foram encontrados em águas residuais, superficiais, subterrâneas e águas de consumo (Lin, Chen & Ding, 2005). Em 2014, Robles-Molina et al., fizeram um estudo de 400 contaminantes em águas superficiais e residuais em diferentes rios e reservatórios do Norte, Centro e Sudoeste da Espanha e encontraram fluometuron (herbicida) e cafeína nas águas superficiais e nicotina e efedrina (medicamento emagrecedor) em águas residuais (todos com concentrações inferiores a  $80 \text{ ng L}^{-1}$ ).

No Brasil, também têm sido feitos vários estudos nessa área. Um deles foi realizado pelo Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), integrando pesquisadores de várias universidades brasileiras (entre elas a UFPR). Realizaram um estudo da qualidade da água de abastecimento público entre os anos de 2011 e 2012 em várias capitais brasileiras, a fim de monitorar alguns contaminantes emergentes. A cafeína foi encontrada em praticamente todos os pontos de coleta. Essa substância não é em si, prejudicial, visto que a quantidade encontrada na água é menor que a quantidade contida em uma xícara de café, mas a cafeína representa a presença de esgoto em águas superficiais e esse é o fato alarmante, pois mostra que o tratamento está sendo ineficiente (Canela et al, 2014). Além da cafeína, nesse estudo também foram encontrados atrazina, triclosan e fenolftaleína nas águas de abastecimento de algumas regiões.

O monitoramento dos contaminantes emergentes se dá principalmente nas águas superficiais já que essas contêm uma maior concentração desses contaminantes, principalmente se forem lugar de descarte de efluentes e também porque o procedimento para o monitoramento em águas superficiais é mais fácil de ser feito que em águas subterrâneas (Naidu et al., 2016).

## 1.1 Analitos

Os compostos de interesse (analitos) escolhidos para esse trabalho, foram: atrazina, cafeína, progesterona e triclosan. A seguir, serão mostradas as aplicações e explicadas algumas características de cada um dos compostos:

### 1.1.1 ATRAZINA

A atrazina (6-cloro, N-etil- N'- isopropil- 1,3,5, triazina- 2,4-diamina), de fórmula estrutural conforme Figura 3, é um herbicida geralmente utilizado nas plantações de milho, abacaxi e cana-de-açúcar. Através de inibição fotossintética, cessa a produção de ATP e mata as pragas. O mecanismo de ação é através da ligação das moléculas do herbicida nos sistemas carregadores de elétrons da membrana do cloroplasto, inibindo o crescimento da planta. Essa reação ocasiona efeitos tóxicos nas plantas e consequentemente, nos seres humanos (Rodríguez-González et al 2014).

Quando em contato com o ser humano, a atrazina pode afetar o sistema endócrino e causar câncer (Švorc, Rievaj & Bustin, 2013) além de diminuir a fertilidade masculina. Enquanto em animais, pode induzir a feminização de anfíbios, (Chen et al., 2009) e ter moderada toxicidade para várias espécies de peixes (Marchetti et al., 2013)

Embora a atrazina tenha sido proibida pela União Européia em 2007, por ser encontrada em águas de abastecimento público acima do limite estabelecido em vários países e ainda continua no meio ambiente contaminando principalmente organismos aquáticos, (Barchanska, Rusek, & Szatkowska, 2012) pois tem mobilidade, persistência e é solúvel em água. Nos Estados Unidos e no Brasil ainda é permitida sua utilização. (US Environmental Protection Agency, 2012)

No Brasil, a atrazina é legislada pela portaria 2914 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo o valor máximo permitido para águas de abastecimento público é  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  e na legislação dos Estados Unidos da América (EUA) o limite máximo permitido para águas de abastecimento público é de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (EPA 1990). Essa legislação diz respeito à mortalidade causada pela atrazina, essa substância não é legislada com relação à estrogenicidade causada nos seres humanos e outros animais.

O limite máximo permitido em águas na Europa é de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (European Commission, 1998) e a presença em vegetais deve ser de  $0,05\text{mg/kg}$ , segundo o conselho da União Européia. (Rodríguez-González et al., 2014).

A atrazina pode se degradar no meio ambiente, especialmente no solo, por hidrólise, formando hidróxi-atrazina (HA) ou dealquilação, formando desetil-atrazina (DEA), deisopropil-atrazina (DIA), desetilhidroxi-atrazina (DEHA) e desisopropilhidroxiatrazina (DIHA). Os produtos de degradação da atrazina formados por dealquilação são mais tóxicos que a atrazina, pois a degradação, aumenta a solubilidade e a polaridade, fazendo com que os compostos sejam mais solúveis em água que a atrazina e assim, tenham uma maior mobilidade no meio ambiente. (Amadori et al., 2013)

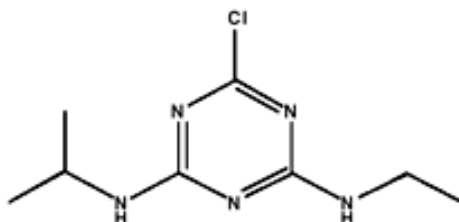


Figura 3: Fórmula estrutural da Atrazina

### 1.1.2 CAFEÍNA

A cafeína é a droga psicotrópica legalizada mais consumida no mundo, através de chás, café ou de medicamentos que contém cafeína em sua composição. É um alcaloide que faz parte de uma família de substâncias chamadas metil-xantinas, muito abundante no plasma humano.

Possui inúmeros efeitos no organismo, como ativação do sistema nervoso central, sistema respiratório e muscular cardíaco. Pode tanto contribuir para a saúde, como trazer malefícios, como náuseas, dores de cabeça e ansiedade. Na gravidez, é associada ao aumento do risco de afetar o crescimento do bebê, aborto espontâneo e diminuição da fertilidade (Talio et al., 2013; Canela et al., 2014).

A cafeína é utilizada como marcador químico para a poluição de superfícies aquáticas com aporte direto de esgoto doméstico, pois é extremamente solúvel em água e permanece nos corpos aquáticos, mesmo com o tratamento feito nas ETA (estações de tratamento de água), pois dependendo do processo realizado, é ineficiente para a remoção de contaminantes orgânicos. (Canela et al., 2014)

A presença de cafeína nos corpos aquáticos deve ser analisada, porque além de ser um indicador de poluição ambiental, é também um indicador de estrogenicidade, de acordo com uma pesquisa feita por Montagner et al (2014), existe a relação da concentração de cafeína com a atividade estrogênica nas amostras. Quando presente na água, a cafeína indica que há contaminantes que alteram as funções estrogênicas na água em baixas concentrações, não sendo possível detectá-los.

A estrutura do composto está representada na Figura 4:

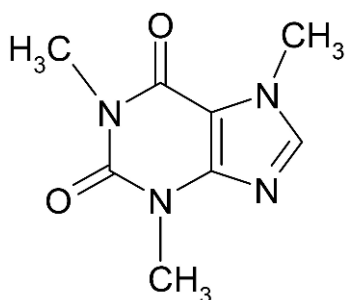


Figura 4: Fórmula estrutural da cafeína

### 1.1.3 PROGESTERONA

É um hormônio esteroide natural, responsável por regular o ciclo reprodutivo feminino. Alguns estudos mostram que a reprodução de peixes foi afetada pela presença de progesterona na água. (Peng et al., 2014)

Vários estudos têm focado em hormônios estrógenos (principalmente estrona e estradiol), mas as concentrações de hormônios progestógenos naturais (progesterona) e andrógenos (testosterona) no meio ambiente é maior, visto que a quantidade excretada pela urina humana é muito mais alta, portanto, a preocupação e os estudos acerca desses hormônios têm crescido bastante. Além da excreção da progesterona natural, ainda há a utilização da progesterona sintética, que é utilizada em vários medicamentos humanos e veterinários (Jin et al., 2013), podendo ser encontrada no leite de bovinos (Xu et al., 2013).

Alguns hormônios, inclusive a progesterona, são adicionados em cosméticos, pois auxiliam no crescimento do cabelo e previnem rugas e elasticidade da pele. Com isso, além de causar problemas no metabolismo humano, ainda causam poluição ambiental (Lei et al., 2014). A estrutura da progesterona está representada na figura 5:

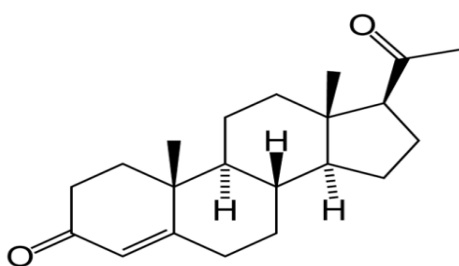


Figura 5: Fórmula estrutural da progesterona

#### 1.1.4 TRICLOSAN

O Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)fenol) é utilizado em vários produtos de higiene pessoal, como desodorantes, xampús e cremes dentais, como antibactericida e fungicida. Em cremes dentais, por exemplo, a adição do triclosan ajuda a prevenir placas e inflamações na gengiva. O Triclosan também contribui no desenvolvimento de organismos resistentes a bactérias (Adgent & Rogan, 2015).

Em 2013, eram utilizadas em média, 350 toneladas desse produto por ano na Europa. Segundo a EPA, o triclosan causa alguns malefícios à saúde humana e outros animais, como disfunções no sistema endócrino devido aos dois anéis fenólicos, e no sistema reprodutor (figura 6), visto que há bioacumulação nos organismos vivos (Pintado-Herrera, González-Mazo, & Lara-Martín, 2014), (Kookana et al., 2013), (C.-F. Wang & Tian, 2015) e (González-Mariño, Quintana, Rodríguez, Schrader, & Moeder, 2011).

Em 2004, o triclosan foi detectado na urina de mais de 70% da população dos EUA. Como resultado a esta exposição, o triclosan pode estar alterando os efeitos dos microorganismos presentes no organismo humano, como por exemplo, a microbiota do intestino.

Além do contato pelos produtos de higiene pessoal, os seres humanos têm contato com o triclosan através da água e solo contaminados, pois já foi detectado em águas residuais, superficiais e sedimentos, além de organismos aquáticos. Também já foi detectado em leite humano, plasma e urina (Gao et al., 2015) (Wang & Tian, 2015).

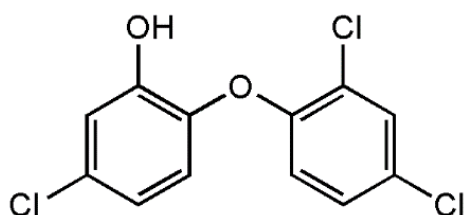


Figura 6: Fórmula estrutural do Triclosan

## 1.2 Propriedades físicas e químicas dos analitos

As características físicas e químicas dos compostos a serem determinados são importantes para prever como se dá o transporte e o destino dos mesmos. Uma das propriedades importantes é o coeficiente de partição octanol/ água (Kow), que define a concentração que pode estar contida na água, assim como em um solvente com menor polaridade (octanol), ou seja, o Kow é uma medida representativa da hidrofobicidade da substância (Hwang, Kwak, & Park, 2010).

Essa propriedade tem sido muito utilizada nas últimas décadas tanto para aplicações científicas quanto técnicas, pois serve de base para explicar a biocatálise, toxicidade em animais marinhos, bioacumulação e atividade biológica de fármacos (Lee & Lin, 2014; Molyneux, 2014).

Quanto maior o Kow, maiores as chances de encontrar a substância no solo e na matéria orgânica, também maior a chance dessas substâncias serem encontradas no tecido adiposo dos animais. As substâncias com Kow de 4 a 7 (compostos considerados hidrofóbicos), são as mais propensas a serem encontradas nos organismos vivos (Baird, 2002; Mackay, 1991).

Outra propriedade importante dos compostos é a constante de dissociação ácida (pKa). Essa constante nos informa sobre a protonação ou desprotonação da substância em solução em um determinado pH, transporte em compartimentos ambientais, atividades biológicas e em química analítica é importante para o estudo de separação e determinação dos compostos de interesse (Kasicka, 2015; Heidary, Radmehr, Khajavi & Mahjub, 2015). Quanto menor o valor do pKa, mais fortemente ácido é o composto e quanto mais ácido o composto for, maior a probabilidade de haver desprotonação em solução aquosa em pH neutro.

Na tabela 1, verifica-se algumas propriedades físico-químicas dos analitos desse trabalho:



Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos compostos a serem determinados nesse trabalho

Analito	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	pKa	Log Kow
Atrazina	215,68	33	1,7	2,34
Cafeína	194,19	20 000	10,1	0,01
Progesterona	314,46	5,6 – 8,8	10,9	3,87
Triclosan	289,54	10	7,9	4,76

Fontes: Embrapa, livro: cafeína em águas de abastecimento público no Brasil, Ghiselli, G; Jardim, 2007, cwea.

### 1.3 Preparo dos padrões

A água é uma matriz complexa, ou seja, contém vários interferentes e os contaminantes emergentes são encontrados na água em níveis traço (mg L<sup>-1</sup>) ou ultratraço (µg L<sup>-1</sup>), portanto é necessário um preparo da amostra, que envolve as etapas de extração, concentração e limpeza, para que os analitos possam ser detectados e não haja a presença de interferentes, que podem gerar resultados errôneos. Na cromatografia é importante a eliminação de interferentes para que a vida útil da coluna seja prolongada.

Um dos métodos de preparo de amostra bastante utilizados é a extração em fase sólida (SPE), que foi proposto em 1976, para suprir as inconveniências da extração líquido-líquido, como alto consumo de solventes orgânicos, difícil automação, formação de emulsões e dificuldade de concentração do analito. Na Figura 7, estão representadas as etapas da SPE:

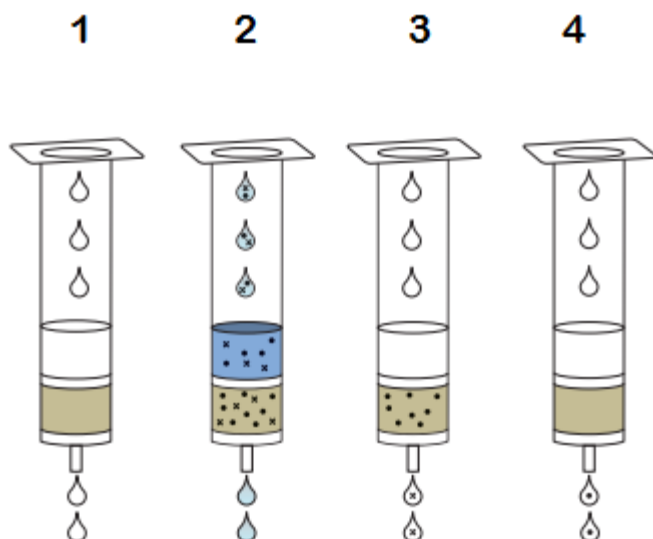


Figura 7: Etapas da extração em fase sólida. Fonte: Livro: Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil.

De acordo com a figura 7, a extração em fase sólida é dividida em etapas, onde:

- 1- Condicionamento do cartucho: elui-se um solvente adequado para ativação do material extrator (é importante manter o cartucho úmido, para que não forme caminhos preferenciais, comprometendo a análise);
- 2- Retenção do analito: é feita a passagem da amostra para retenção do analito, sendo que a vazão da amostra geralmente é em torno de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , de forma que os analitos não passem pelo cartucho sem serem retidos;
- 3- *Clean-up*: É necessária uma lavagem para remoção de impurezas, utilizando um solvente que não interaja com o analito;
- 4- Eluição: passagem de um solvente adequado para retirar o analito do cartucho e proceder com a análise.

As fases extratoras são compactadas dentro de um cartucho semelhante a uma seringa e podem ser utilizados diversos tipos de materiais para essas fases. A mais comum é o octadecilsilano quimicamente ligado à sílica, conhecido como C18, representado na figura 8. Essa fase extratora tem a desvantagem de poder ser utilizada somente na faixa de pH de 2 a 8 e conter grupos silanóis, que

podem reter os compostos básicos irreversivelmente. Por essa desvantagem, outros sorventes podem ser utilizados, como fases poliméricas, carbono grafitizado, sorventes mistos (cadeias alquilas com ligantes trocadores iônicos) e polímeros impressos molecularmente. Várias alternativas para fase extratora têm sido estudadas em vários centros de pesquisa.

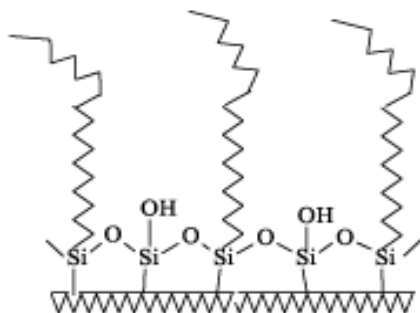


Figura 8: Estrutura química da fase extratora C18- hidrocarbonetos de 18 carbonos são ligados quimicamente aos grupos silanóis da sílica.

Zou et al.(2013) determinaram hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) utilizando um cartucho preparado a partir de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ligados na sílica e TBCD (1,4,7,10-tetrabenzil- 1,4,7,10-tetraazociclododecano), obtendo altas taxas de recuperação e bons parâmetros de mérito.

González-Mariño et al.(2009) fizeram um estudo usando com fase extratora polímeros molecularmente impressos (MIP), que tiveram os respectivos desempenhos comparados a duas fibras comerciais, para quantificar três anfetaminas em águas residuais e concluíram que a fibra de MIP foi a mais eficiente.

Os cartuchos com fases poliméricas são utilizados para extrair tanto compostos polares, como não- polares, pois propiciam um equilíbrio lipofílico-hidrofílico. Por extraírem uma vasta gama de substâncias, além dos analitos podem extrair algumas interferências, prejudicando a análise (Cardoso, 2011). Uma fase polimérica bastante utilizada é a Oasis HLB da Waters®, a estrutura dessa fase extratora está representada na figura 9. Essa fase extratora possui uma maior área superficial que as fases extratoras siliconadas, portanto, há uma

maior chance dos analitos serem retidos e pode ser utilizada para compostos ácidos, básicos e neutros.

Tanto os materiais empregados na sorção, quanto os solventes utilizados, dependem das características do analito, o que leva a uma alta seletividade (Ferreira, 2012). Também tem sido relatada a utilização de extração em fase sólida em série, na qual coloca-se cartuchos com diferentes características em série. Essa técnica é utilizada para viabilizar a determinação de vários analitos de uma só vez, reduzindo o tempo de análise e a contaminação de amostras (Grazieli & Collins, 2011).

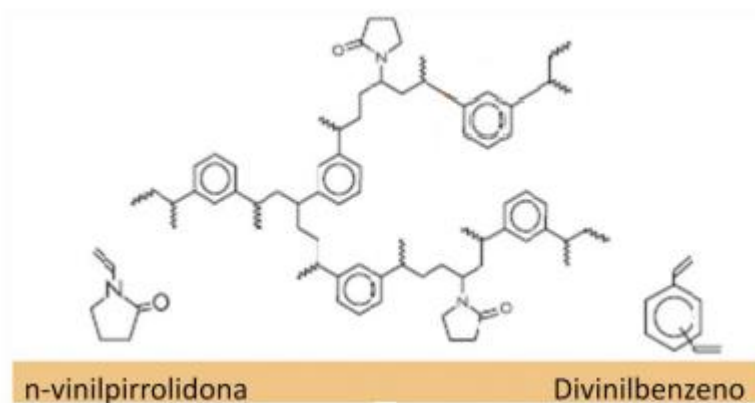


Figura 9: Estrutura química da fase extratora do cartucho HLB-Oasis da Waters®

#### 1.4 Filtração

O processo de filtração também é uma etapa importante. Esse procedimento deve ser executado antes da extração, na eliminação de interferentes. Alguns estudos são feitos para estudar as interações entre analitos e o meio filtrante, pois a interação pode acarretar em perdas na recuperação. Liz & Nagata (2012), testaram diferentes filtros (poliéster de celulose, fibra de vidro e papel filtro quantitativo) em cartucho comercial de sílica C18 para determinação

de três hormônios. A melhor recuperação foi para a fibra de vidro, obtendo-se percentuais em torno de 95%.

Um estudo realizado por Han, Qiu, & Gao, 2010, mostrou que na determinação de estrona (um hormônio natural feminino) em águas naturais a melhor membrana para ser utilizada foi a de fibra de vidro, visto que essa substância possui um pKa acima de 10 e baixa solubilidade em água, portanto, em solução aquosa as moléculas ficam neutras, sendo mais difícil de adsorver na membrana, o que causa menos perdas do analito. Comparando-se com outras membranas de materiais como nylon, acetato de celulose e politetrafluoretileno (PTFE), a que teve menor taxa de retenção da estrona foi a de fibra de vidro (2,3%).

A membrana de fibra de vidro tem sido bastante utilizada por suas características de resistência mecânica e resistência ao calor e além disso tem um baixo custo (Luo et al., 2015).

Alguns problemas podem ocorrer durante a filtração, no caso de amostras aquosas que contém substâncias coloidais pode ocorrer entupimento dos poros da membrana, aumentando o tempo de filtração e limitando o volume de amostra, diminuindo a taxa de recuperação de determinados poluentes. (Liz & Nagata, 2012)

## **1.5 Determinação de contaminantes emergentes em água**

As técnicas analíticas mais empregadas na determinação dos contaminantes emergentes são cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em fase gasosa (GC). A técnica HPLC tem altas exatidão e precisão, além de versatilidade, alta sensibilidade e seletividade. A cromatografia em fase gasosa tem a desvantagem de muitos analitos precisarem de derivatização (uma reação para que os compostos tornem-se voláteis), com o uso da cromatografia em fase líquida não é necessário (Švorc et al., 2013; Chen, Zhang & Jones, 2012).

### 1.5.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação em que a amostra se distribui em duas fases: a fase estacionária, que é fixada dentro da coluna e a fase móvel, que é líquida e composta por uma mistura de solventes. As separações resultam dos processos de partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, depende da fase estacionária que é utilizada.

Os componentes do sistema são: uma bomba, que transporta a fase móvel pelo sistema, um reservatório para a fase móvel, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detector e um computador para o processamento dos dados. A figura 10, mostra o esquema do sistema cromatográfico.

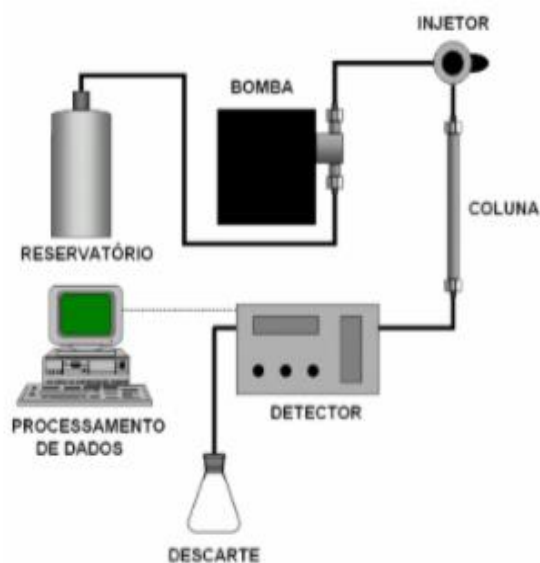


Figura 10: Esquema do sistema cromatográfico da cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC). Fonte: <http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm>

É importante que a fase móvel seja filtrada antes de colocada no reservatório, pois qualquer material particulado que possa haver na coluna é prejudicial à bomba e ao injetor. É necessário também que seja feita a retirada de gases dissolvidos da fase móvel, pois as bolhas de ar podem causar uma flutuação na vazão da fase móvel na bomba e causar problemas no detector.

O sistema de HPLC pode ser utilizado de duas formas: com fase normal, onde a fase estacionária é polar e com fase reversa, onde a fase estacionária é apolar. A mais comum é com fase reversa.

A fase estacionária com fase reversa consiste em uma coluna com partículas muito pequenas (3 a 10  $\mu\text{m}$ ), que são empacotadas dentro da coluna. Essas partículas são esféricas, porosas e compostas por sílica quimicamente ligada a um material apolar, sendo o mais comum o octadecil, ou seja, cadeias de 18 carbonos. Também é comum, no lugar do octadecil, encontrar fenil ou octil

### 1.5.2 Detectores

Existem vários tipos de detectores que podem ser utilizados em HPLC, um deles é o detector espectrofotométrico. Esses detectores contêm uma célula de fluxo, localizada no final da coluna. Quando a amostra é eluída da coluna, passa pela célula de fluxo, onde absorvem radiação e a mesma é detectada pela alteração do nível de energia dos elétrons da amostra. Existem três tipos de detectores espectrofotométricos: os de comprimento de onda fixo, comprimento de onda variável e múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo, possuem uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão e os de comprimento de onda variável contêm uma lâmpada de deutério e um monocromador para que o comprimento de onda seja selecionado pelo operador. Detectores de comprimento de onda múltiplo medem a absorbância em dois ou mais comprimentos de onda, simultaneamente, esses são chamados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nesse detector, a radiação é absorvida pela amostra e dispersada em uma grade, logo após é focalizada em um conjunto de fotodiodos, assim, toda a faixa do espectro Ultravioleta- Visível é detectado, com isso, são selecionados os melhores comprimentos de onda para cada analito, aumentando a sensibilidade do método (Silva, B. J. G., 2007)

Na figura 11, encontra-se o esquema de um detector de arranjo de diodos:

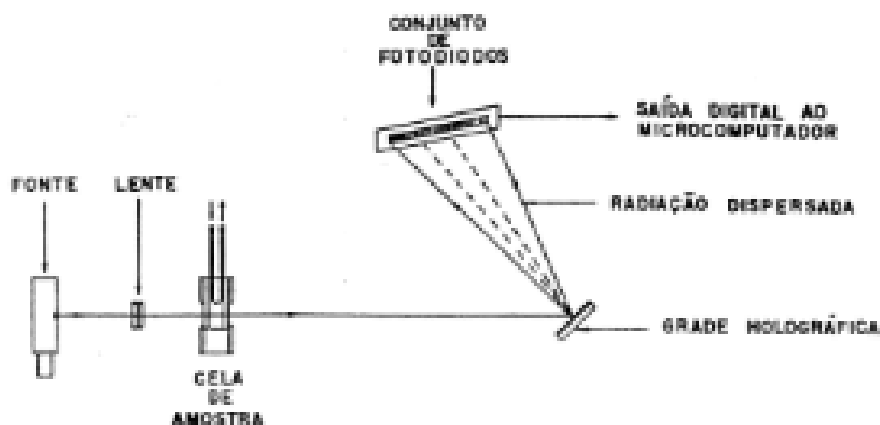


Figura 11: Esquema de um detector de arranjo de diodo (DAD). Fonte: [www.crqlv.org.br](http://www.crqlv.org.br)

## 1.6 Espectrofotometria no UV-VIS

A espectrofotometria UV-Vis (Ultravioleta- Visível) é um método de análise espectroscópico, ou seja, baseado na interação da energia radiante (luz) com as moléculas da amostra. Essa interação faz com que elétrons sejam transferidos entre níveis de energia (do estado fundamental para o estado excitado). A quantidade de radiação absorvida pela amostra é medida pelo equipamento e as informações são obtidas através dessa quantificação.

As radiações ultravioleta e visível, situam-se entre o infravermelho e os raios-x no espectro eletromagnético, sendo a faixa de comprimento de onda da região UV de 180 nm - 380 nm e da região Visível de 380 - 780nm.

A figura 12, mostra o processo de absorção de radiação pela amostra e o resultado da análise por Uv-Vis:

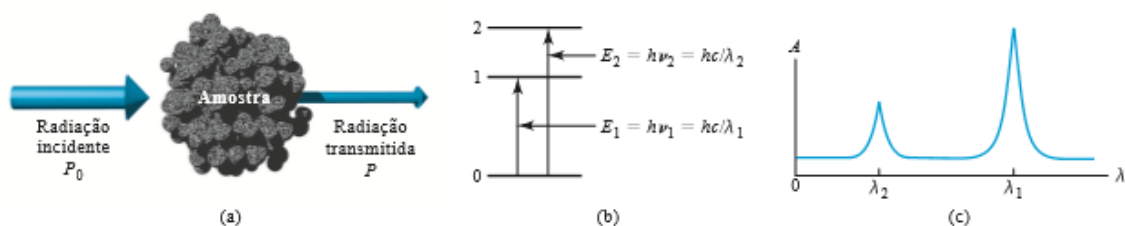




Figura 12: Processo de absorção da radiação pela amostra e o resultado da análise por UV-Vis. A radiação incide na amostra, uma parte da radiação é absorvida e outra parte transmitida (a). A radiação incidente deve fazer com que os elétrons de valência sejam excitados para pelo menos um dos níveis de energia mostrados em (b). O resultado é um espectro de absorção como demonstrado em (c).

A absorção de diferentes frequências da radiação eletromagnética depende da estrutura de cada molécula, portanto, cada espécie absorve frequências próprias de radiação, nesse processo, a energia é transferida para a molécula e a intensidade da radiação incidente é atenuada (Skoog, 2006).

### 1.6.1 Lei de Lambert-Beer

Conhecida como Lei de Beer, a lei da absorção mostra como, quantitativamente, a absorção depende da concentração da amostra e da extensão do caminho em que a radiação atravessa (também chamado de caminho óptico). Quanto maior a concentração da amostra e mais longo o caminho óptico, maior é a atenuação do feixe, ou seja, maior será a absorbância. Essa lei pode ser expressa em uma equação:

$$A = \epsilon bc$$

onde:

A= absorbância;  $\epsilon$ = constante de absortividade molar ( $\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ); b= distância do caminho óptico (cm); c= concentração da amostra ( $\text{mol L}^{-1}$  ou  $\text{g L}^{-1}$ ) (Skoog, 2006).

## **1.7 Parâmetros de mérito**

Quando proposto um método analítico, é necessário que seja validado, que os resultados expressem confiança, que o método tenha condições de ser utilizado quando necessário e aplicado por qualquer pessoa. A validação é realizada através de estudos em laboratório, de acordo com as normas de agências reguladoras, como Anvisa, Inmetro e Iupac.

As exigências dessas agências são baseadas em parâmetros que são chamados de figuras ou parâmetros de mérito. Os principais parâmetros que devem ser analisados são: limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade, linearidade e robustez.

### **1.7.1 Limite de detecção**

É a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo equipamento. Pode ser calculada por parâmetros da curva analítica, através da relação sinal ruído.

### **1.7.2 Limite de quantificação**

É a menor concentração do analito que pode ser quantificada ( ou medida), tendo uma incerteza máxima de 10%. Pode ser calculado através de parâmetros da curva analítica ou através da relação sinal ruído.

### **1.7.3 Precisão**

É o grau de concordância entre vários valores medidos que estejam próximos entre si, ou seja, que haja uma repetibilidade para no mínimo, 3

replicatas no nível de concentração requerido. Pode ser expresso pela estimativa do desvio padrão (RSD), que é também conhecido como coeficiente de variação (CV).

#### **1.7.4 Exatidão**

É o grau de conformidade de uma medida com relação a um valor verdadeiro. Pode ser calculado através de ensaios de recuperação ou comparação com materiais certificados.

#### **1.7.5 Seletividade**

É a determinação do analito em matrizes complexas, sem que outras substâncias possam interferir na determinação da substância de interesse.

#### **1.7.6 Linearidade**

Os resultados obtidos devem ser diretamente proporcionais à concentração do analito. Para isso, observa-se o coeficiente de determinação da curva analítica. A IUPAC recomenda que o valor de  $R^2$  seja  $>0,995$ .

#### **1.7.7 Robustez**

Todo método analítico robusto é aquele que não tem variação nos resultados quando pequenas alterações são feitas, como por exemplo na temperatura, analista, pH ou tempo (Valderrama, Braga, Poppi, 2008).

## 1.8 Amostragem

Uma das principais etapas de um processo analítico é a amostragem, entretanto, segundo Joss(2010), a maioria dos trabalhos publicados que abordam a determinação de contaminantes emergentes em águas não tem dado devida atenção a esse aspecto. Dos 87 trabalhos publicados que os autores analisaram, apenas 5% foram desenvolvidos com a preocupação de fazer um planejamento robusto para a amostragem, na maioria desses trabalhos a variação nas concentrações que ocorre em um curto período de tempo foi ignorada. O ambiente aquático sendo dinâmico, se modifica constantemente, logo a concentração de poluentes nesses ambientes também está sujeita a mudanças. As variações nas concentrações das espécies químicas em um corpo d' água podem ocorrer em um curto ou longo prazo e isso terá influência na frequência e no modo de amostragem.

Como exemplo de variações pode-se citar a precipitação pluviométrica, que pode ter impacto no destino dos poluentes em um corpo d' água e a descarga de esgoto (tratado ou não), cuja carga de poluentes varia ao longo do dia, variando a concentração dos poluentes (Joss, 2010).

Um protocolo de amostragem adequado, juntamente com uma análise química efetiva, pode ajudar a compreender melhor a ocorrência e o destino dos contaminantes emergentes.

É importante que as coletas de amostra para o monitoramento da água, sejam representativas para toda a extensão da amostra, por isso, é importante que seja feito um estudo de base da melhor estratégia a ser adotada, com base em intuição, experiência e conveniência. A frequência, a distribuição do espaço e o número de amostragens podem interferir nos resultados obtidos (Do, Lo, Chiueh, Anh, & Thi, 2012; Y. Wang, Wilson, & Vanbriesen, 2015).

## 1.9 Justificativa

Os contaminantes emergentes podem causar diversos malefícios à saúde dos humanos e de outros animais, como câncer, problemas no sistema endócrino e no sistema reprodutor. Como essas substâncias não são legisladas, não há como saber em qual concentração elas podem ser tóxicas. É necessário o monitoramento dessas substâncias no meio ambiente para que se melhore os sistemas de tratamento de água e esgoto, já que algumas substâncias como a cafeína, são marcadores de contaminação por esgoto na água, e para que agências reguladoras possam legisla-las, para diminuir o consumo dessas substâncias, diminuindo assim, os efeitos tóxicos causados por elas.

Para a determinação dessas substâncias, é necessário utilizar técnicas de preparo de amostra que sejam sensíveis, para extrair e concentrar os analitos que estão presentes em baixas concentrações em matrizes complexas. No caso da extração em fase sólida, é necessário o estudo de diferentes fases extratoras para barateamento do custo das fases e eficiência cada vez maior para um maior número de compostos. Os métodos analíticos têm que ser estudados e validados para que se possa detectar de forma confiável os compostos de interesse.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar diferentes fases extratoras comerciais para serem utilizadas na etapa de extração em fase sólida (SPE), na determinação de diferentes compostos que fazem parte de diferentes classes do grupo dos contaminantes emergentes, presentes em águas naturais e destinadas ao abastecimento público.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Desenvolver e validar um protocolo analítico para determinação de contaminantes emergentes via HPLC-DAD
- Testar adsorventes comerciais para extração em SPE
- Otimizar o método de extração
- Determinar contaminantes em águas superficiais

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes**

Os reagentes utilizados foram acetonitrila, acetona e o metanol. Esses solventes foram adquiridos da J. T Baker grau HPLC, todos com 99,9% de pureza. A água utilizada como fase móvel foi purificada em um sistema de água ultrapura Milli-Q, com resistividade de 18,2 MΩ cm.

Os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich, com purezas de 99% ou superior.

#### **3.2 Limpeza de vidrarias e materiais**

Com o objetivo de evitar contaminação, todas as vidrarias utilizadas foram previamente deixadas submersas em etanol 3% (v/v) por 24h, após, enxaguadas com água da torneira (10X), água destilada (5X) e água ultrapura (5X). Depois de secas, foi passado acetona grau HPLC e deixadas em forno mufla a 450°C durante 4h (US EPA 2010). A última etapa não foi realizada para vidrarias que apresentam precisão volumétrica e nem nos materiais plásticos, como as ponteiras.

Para a extração, foi necessário proceder a lavagem de todas as peças utilizadas para tal, da maneira citada anteriormente para vidrarias. O frasco que é colocada a solução que passa pelo cartucho também foi lavado e deixado em mufla a 450° C. Para as peças de plástico, o procedimento é feito somente até a limpeza com acetona.

### 3.3 Preparo de amostras

Os padrões foram preparados conforme metodologia 1694 e 1698 da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (U.S. EPA, 2010) dissolvendo aproximadamente 5 mg de cada um (atrazina, cafeína e progesterona) e dissolvendo-os em 10 mL de metanol, obtendo-se uma solução padrão de cada um de aproximadamente 500 mg L<sup>-1</sup>.

O único padrão líquido que precisou ser diluído foi o metil- triclosan. Foi preparado a partir de 5 µL do padrão, adicionado em 10mL de metanol em um balão volumétrico, obtendo-se uma solução padrão de 5000 mg/L.

Após essa etapa, aproximadamente 200 µL de cada padrão foram diluídos em um balão volumétrico, para um volume final de 10 mL, obtendo-se uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup>. Também foi feito um mix com os padrões de cafeína, atrazina, metil-triclosan e progesterona, adicionando 200 µL de cada padrão (com excessão do metil-triclosan, que tem uma maior concentração) em um balão volumétrico e o volume completado para 10 mL.

Todas as soluções foram armazenadas em congelador, em frascos âmbar, para evitar perdas por volatilização.

Posteriormente, foi decidido que o metil-triclosan não seria mais estudado, pois a base do pico ficou muito alargada. A polaridade do analito é muito baixa, com isso tem uma interação forte com a fase estacionária, assim não seria viável trabalhar com esse analito. Foi necessário então, fazer um padrão de triclosan, para substituí-lo. O procedimento adotado foi o mesmo que para os outros analitos (pesagem de aproximadamente 5 mg, dissolvido em 10 mL de metanol e posteriores diluições até a concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>).

O presente projeto de pesquisa foi inicialmente concebido de maneira que as análises seriam realizadas em um sistema de cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS). Contudo, devido a uma série de problemas recorrentes no referido equipamento e também em outros cromatógrafos que operam em fase gasosa, optou-se pelo emprego de um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (HPLC).



### 3.4 Espectros UV- Vis

Antes do método cromatográfico, foram feitos espectros UV-Vis em um equipamento da Perkin Elmer (Lambda 1050), para a confirmação dos comprimentos de onda que os analitos absorvem, para escolher o comprimento de onda a ser utilizado no detector do HPLC e para que os cromatogramas de cada um dos analitos seja confirmado através dos respectivos comprimentos de onda.

Para essa etapa, foi preparada uma solução de 25 mg L<sup>-1</sup> a partir da solução estoque previamente preparada. Nesse procedimento diluiu-se 150 µL da solução mãe em 3 mL de solução. Os espectros de absorbância foram adquiridos na região de 190- 350 nm.

### 3.5 Método do HPLC

As determinações por HPLC foram realizadas em um Cromatógrafo Varian 920LC com um detector com arranjo de diodo (DAD), marca Sartorius, modelo CP225, para trabalhar na região do UV. Foi utilizada uma coluna com fase estacionária octadecil-silano (C18) da Kromatex de 250 mm x 4,6 mm x 5 µm. Foi utilizado o injetor automático da marca Varian, modelo LC920, e para a aquisição dos dados foi empregado o programa Galaxie 1.9.

Para a análise via HPLC os padrões de 10 mg L<sup>-1</sup> foram diluídos com metanol obtendo-se uma concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>.

Os comprimentos de onda utilizados no detector foram selecionados considerando-se os comprimentos de onda de absorção máxima dos analitos, pesquisados anteriormente ao início dos experimentos. Foram escolhidos os comprimentos de onda da cafeína (272 nm) e da progesterona (240 nm) para monitoramento em tempo real.

Antes da análise cromatográfica, é importante filtrar os solventes da fase móvel, pois mesmo sendo grau HPLC, eles podem ter micropartículas. Para essa etapa a acetonitrila foi filtrada em uma membrana da Merck®, feita de PTFE (Teflon) de 0,22 µm de porosidade. É necessário também retirar os gases dissolvidos nos solventes que compõem a fase móvel, pois caso esses gases não sejam retirados, podem formar bolhas dentro do equipamento, prejudicando o funcionamento do mesmo. Para isso, os solventes foram colocados em banho de ultrassom durante 30 minutos. Depois de filtrar e retirar os gases, os solventes puderam ser utilizados.

### **3.6 Otimização das condições cromatográficas**

O desenvolvimento do método cromatográfico para os analitos foi baseado no método estabelecido por Montagner & Jardim, 2011. Esse método emprega fase móvel com acetonitrila: solução ácida pH 4 com ácido clorídrico, começando com 90% de água, indo até 10% em 30 minutos. Logo após, a proporção de água foi 8% e depois 5%. Terminada essa etapa, voltou-se às condições iniciais.

Como não foi possível a detecção de todos os analitos com esse método, foram utilizadas diversas eluições por gradiente, com diferentes proporções das fases móveis. Foram testadas fases móveis com acetonitrila: solução ácida pH 4, acetonitrila: água ultrapura, metanol: solução ácida pH 4 e metanol: água ultrapura. Em todas essas fases móveis foram testadas várias proporções para verificar qual seria mais adequada para detectar e quantificar os analitos, sempre começando com 80% a 90% de água, diminuindo a proporção de água no decorrer da corrida, até chegar em 10% de água e voltando-se às condições iniciais.

Borges, Bottoli, & Collins, 2010, mostraram que a temperatura da coluna em cromatografia líquida de alta eficiência, influencia no fator de retenção dos analitos, que é o tempo de permanência do analito na fase estacionária e na fase

móvel, portanto, foram feitas análises em três temperaturas diferentes: 20° C, 26° C e 30° C.

Também foram feitas análises em três vazões diferentes da fase móvel: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, 1,0 mL min<sup>-1</sup> e 1,2 mL min<sup>-1</sup>.

### **3.7 Otimização dos testes para extração em fase sólida (SPE)**

A extração é feita com o objetivo de isolar e concentrar os compostos de interesse. Como não há uma metodologia específica para esses analitos, é necessário fazer testes para avaliar a vazão da solução contendo os padrões na passagem pelo cartucho, assim como os solventes utilizados em todas as etapas do método.

Foram feitos testes para a extração em fase sólida com cartucho C18, preparando-se 1L de uma solução de 0,1 µg L<sup>-1</sup> de todos os analitos em água ultrapura. Para o preparo dessa solução, foi dissolvido 1mg de cada um dos padrões em 200 mL de água ultrapura, obtendo-se uma solução estoque de 5 mg/L. Essa solução é diluída todas as vezes que o procedimento da extração é realizado.

O procedimento de extração, incluindo o condicionamento do cartucho e eluição dos analitos foi baseada no livro “Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil”, que foi lançado pelo INCTAA, do qual o Grupo de Química Ambiental da UFPR também participou. Nesse estudo, a etapa de extração foi padronizada na Unicamp e consiste em um sistema como mostrado na figura 13:



Figura 13: Sistema para a execução da extração em fase sólida.

O cartucho foi condicionado com duas alíquotas de 3 mL de metanol e uma de 3 mL de água ultrapura. Logo após foi feita a extração passando-se 1 L de solução pelo cartucho, com uma vazão de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , utilizando-se uma bomba peristáltica Gilson®, conforme mostra a figura 11.

Os cartuchos foram então, secos com gás nitrogênio, de pureza 99,99%.

A eluição foi feita com duas alíquotas de 2,5 mL de metanol e uma de 2 mL de acetonitrila em um sistema manifold da Ashcroft®, com uma bomba de vácuo Tecnal® para ajudar na passagem dos solventes e logo após foi feita a evaporação dos solventes e consequente concentração em um concentrador de amostras a vácuo da Christ®, colocando as soluções no concentrador, em uma temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  até completa evaporação dos solventes por rotação. Logo após foi feita a ressuspensão em 1,5 mL de metanol para análise em HPLC.

Os outros testes realizados foram mudando o solvente de eluição, foi feita somente com metanol e somente com acetonitrila, utilizando-se a mesma quantidade de solventes utilizada na mistura de solventes da outra eluição. Foram feitos dois testes mudando-se a vazão para  $4 \text{ mL min}^{-1}$  e  $6 \text{ mL min}^{-1}$ .

A figura 14 mostra o fluxograma com as etapas da extração:

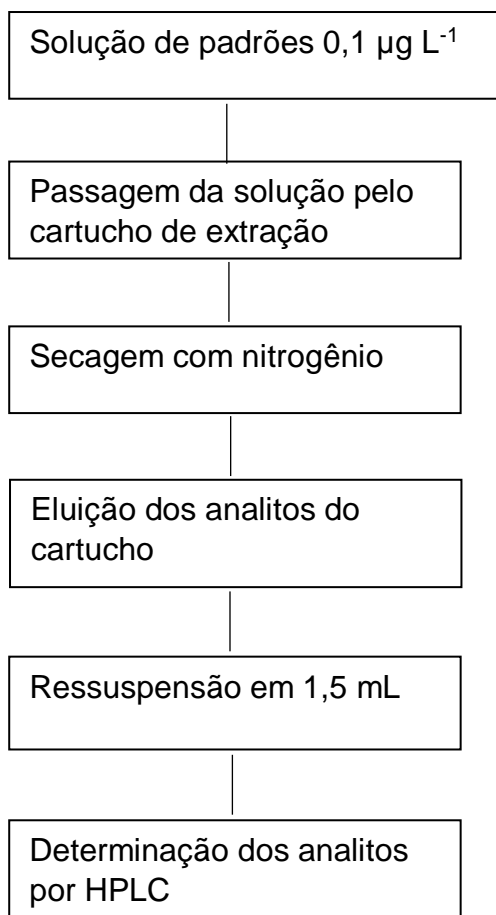


Figura 14: Fluxograma das etapas de extração.

### 3.8 Amostragem

Para avaliação da qualidade da água dos rios e de abastecimento público, com relação a alguns contaminantes emergentes, foram feitas coletas em uma residência e três rios de Curitiba e Região Metropolitana.

A amostragem foi feita primeiramente coletando-se água da torneira de uma residência, localizada no bairro Cajuru (Vila Oficinas), cuja latitude é -25.450868 e a longitude -49.208877 diretamente no frasco de coleta. A coleta foi feita dia 10/04/2016, com uma vazão de 400 mL min<sup>-1</sup> e coletado um litro a cada duas horas, totalizando 4 litros. A amostra foi conservada em geladeira até o dia posterior, filtrada em membrana de fibra de vidro 0,7 µm e armazenada em

geladeira a aproximadamente 4° C durante 24h para então ser realizada a extração em fase sólida.

Depois de analisada a amostra da água de abastecimento, foi feita a coleta nos rios Belém (Uberaba), Lagoa do parque náutico (Boqueirão), Iguaçu (São José dos Pinhais) e Iraí (Pinhais), representados na figura 14. O projeto foi desenvolvido no laboratório do Grupo de Química Ambiental (GQA), localizado no departamento de química da UFPR, em Curitiba/ PR.

A coleta do Rio Iguaçu e Rio Belém foi feita no dia 11/07/2016 e do Rio Iraí e da lagoa no dia 28/04/2016. Foram coletados 4 litros de água em cada rio. Primeiramente a água foi coletada em um balde de metal previamente limpo. A água foi então, transferida para um frasco de vidro de 4 litros previamente descontaminado conforme descrito no item 3.2. Após preenchimento do frasco com a amostra, foi tampado e armazenado em isopor com gelo.

Na tabela 2, constam as coordenadas geográficas dos pontos de amostragem e a informação de horário da coleta. As figuras 15 e 16 exibem os dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), referentes à quantidade de chuva acumulada no mês de abril e Julho. Vale destacar a alta intensidade de chuvas no dia anterior à coleta de abril, a alta intensidade de chuvas pode ocasionar em diluição dos analitos.

Tabela 2: Identificação dos pontos de coleta das amostras dos rios de Curitiba e Região Metropolitana.

	Latitude (S)	Longitude (W)	Horário de início da coleta
Rio Belém	-25.477274	-49.241521	09:15
Lagoa do parque náutico	-25.526623	-49.222540	10:00
Rio Iguaçu	-25.513611	-49.202136	10:30
Rio Iraí	-25.451588	-49.122158	10:50

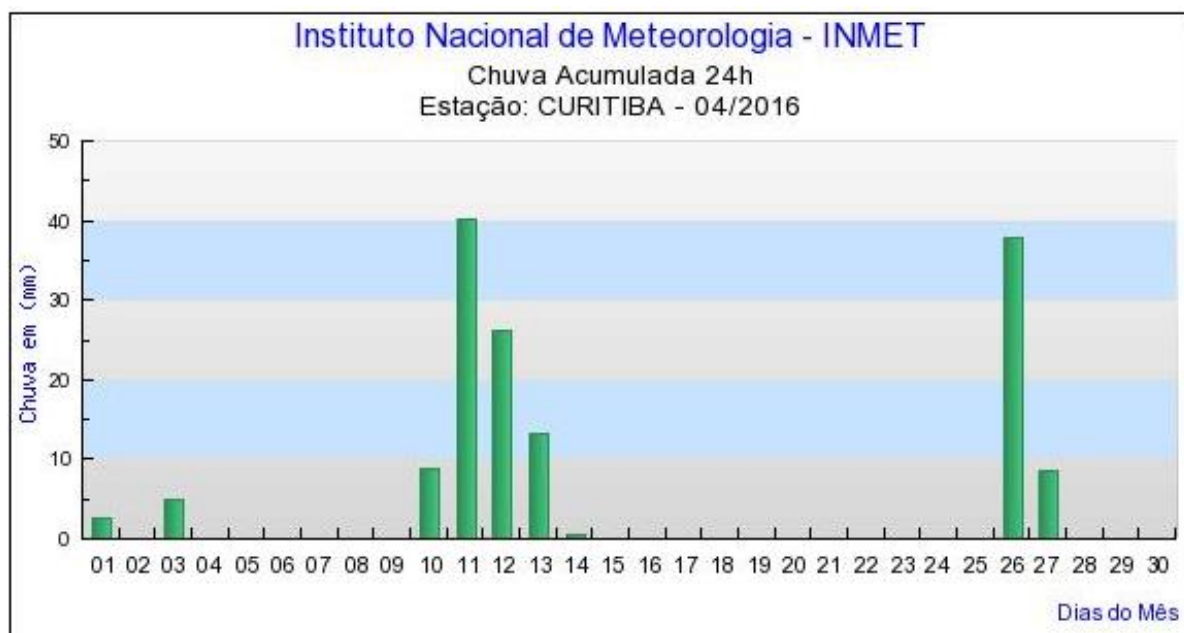


Figura 15: Índice de chuva acumulada no mês de abril/2016.

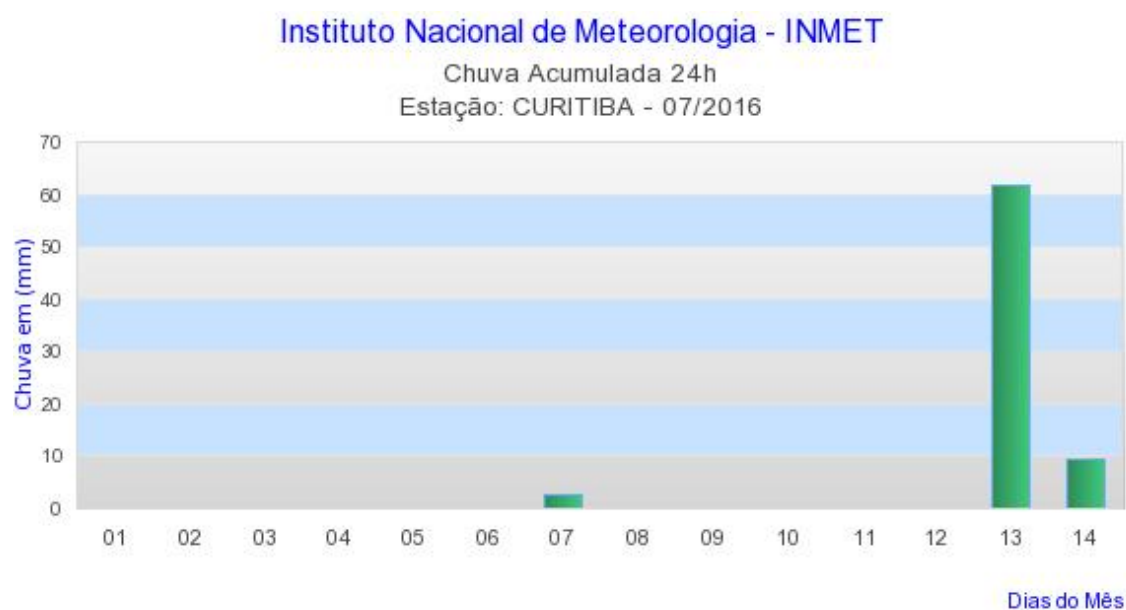
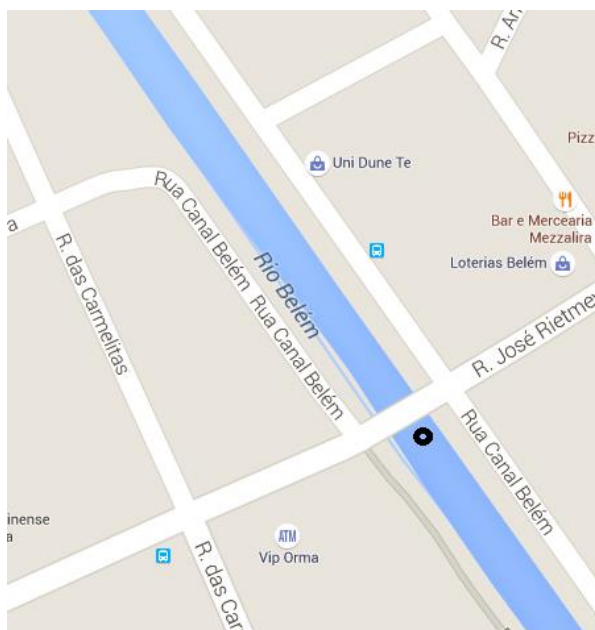
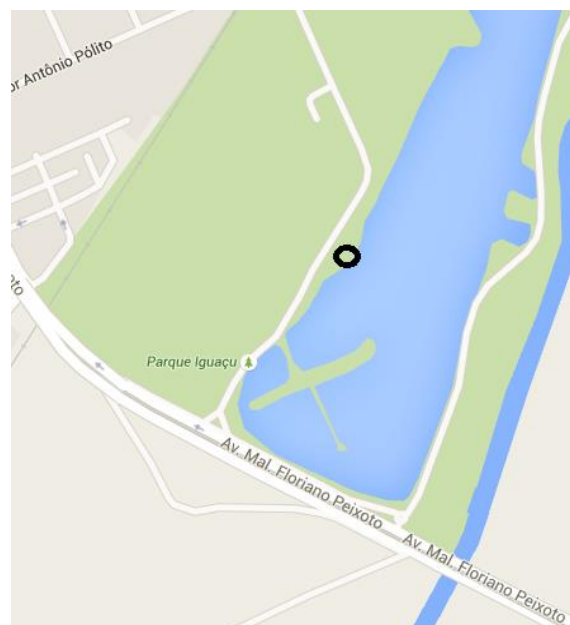


Figura 16: Índice de chuva acumulada no mês de julho/2016.

As localizações dos pontos de coleta estão representados no mapa da figura 17:



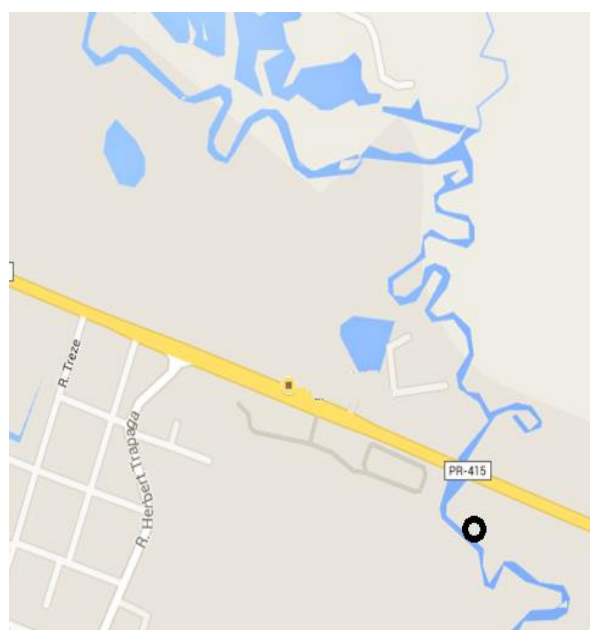
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 17: Localização das coletas de amostra em cada um dos rios, sendo (A): Rio Belém, (B) Lagoa do parque náutico, (C) Rio Iguaçu e (D) Rio Iraí. Fonte: google maps



A bacia do Iguaçu está dividida em três unidades: baixo Iguaçu, médio Iguaçu e alto Iguaçu, sendo a parte do alto Iguaçu localizada no município de Curitiba, onde vivem aproximadamente 2,5 milhões de pessoas e tem intensa atividade industrial. Nessa região, foi feita a coleta da amostra. O rio Iguaçu é o maior dentre os rios que são totalmente paranaenses e é formado pelos rios Iraí e Atuba na parte leste de Curitiba, ao atravessar a região de Curitiba, o rio Iguaçu recebe como principais afluentes os rios Iraí, Atuba, Belém, Barigui e Passaúna e tem uma área total de 54.820,4 Km<sup>2</sup> dentro do estado do Paraná, essa área é equivalente a 28% da área total do estado.

As bacias do rio Iguaçu, Piraquara e Iraí são utilizadas para fornecer água de abastecimento público para metade da população de Curitiba e Região Metropolitana (IAP 2015)

A bacia do Rio Iraí é o principal manancial do rio Iguaçu. É protegida por uma Área de Proteção Ambiental (APA) desde maio de 1993 (site Sanepar, 1999).

O Rio Belém é localizado exclusivamente em Curitiba, com 84km<sup>2</sup> de área, corta a cidade de norte a sul. O estado de conservação do rio é precária, em 2005, o IAP classificou-o em uma faixa de poluído a muito poluído. Estima-se que 90% da poluição seja causada por esgoto doméstico e 10% por efluentes industriais (Bollmann, Harry; Edwiges, 2008).

Na figura 18 estão representados os locais das coletas de amostras de água dos três rios:



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 18: Locais das coletas de amostras, sendo (A) Rio Belém, (B) Lagoa do parque náutico, (C) Rio Iguaçu e (D) Rio Iraí. Fonte: própria

Logo após a coleta, a água foi filtrada em membrana de fibra de vidro 0,7 micrômetros e armazenadas em geladeira a aproximadamente 4° C. A extração foi feita 24h após a filtração para evitar a degradação dos analitos.

Para os rios Belém e Iguaçu, foi necessário fazer uma diluição das amostras de 10 vezes. Para isso, após a concentração e ressuspensão em

metanol, foi pego 150  $\mu\text{L}$  da amostra concentrada e diluída em 1,5 mL de solução, com metanol.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Espectros UV- Vis

Foram feitos espectros com equipamento ultravioleta-visível (UV-Vis) para confirmar o comprimento de onda máximo de cada um dos analitos. Nesse experimento, foi feito triplicata para cada um dos analitos, em uma concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol e os espectros estão representados nas figuras 19, 20, 21 e 22 como uma média dos três espectros:

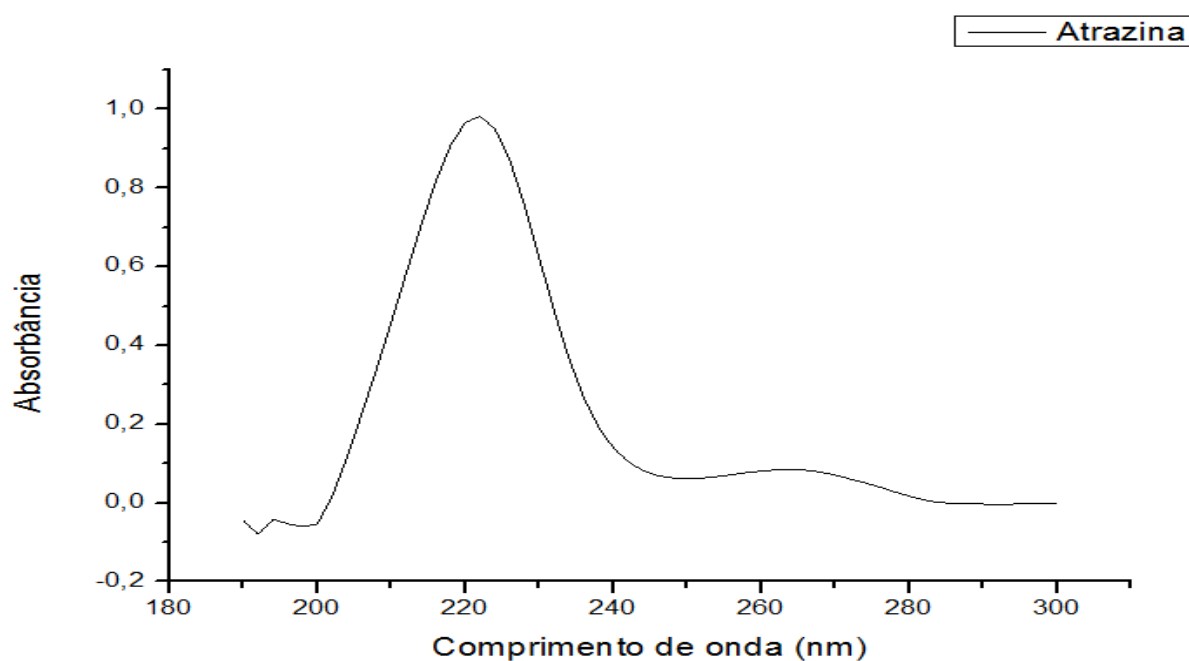


Figura 19: Espectro UV-Vis da atrazina, obtido em uma concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol.

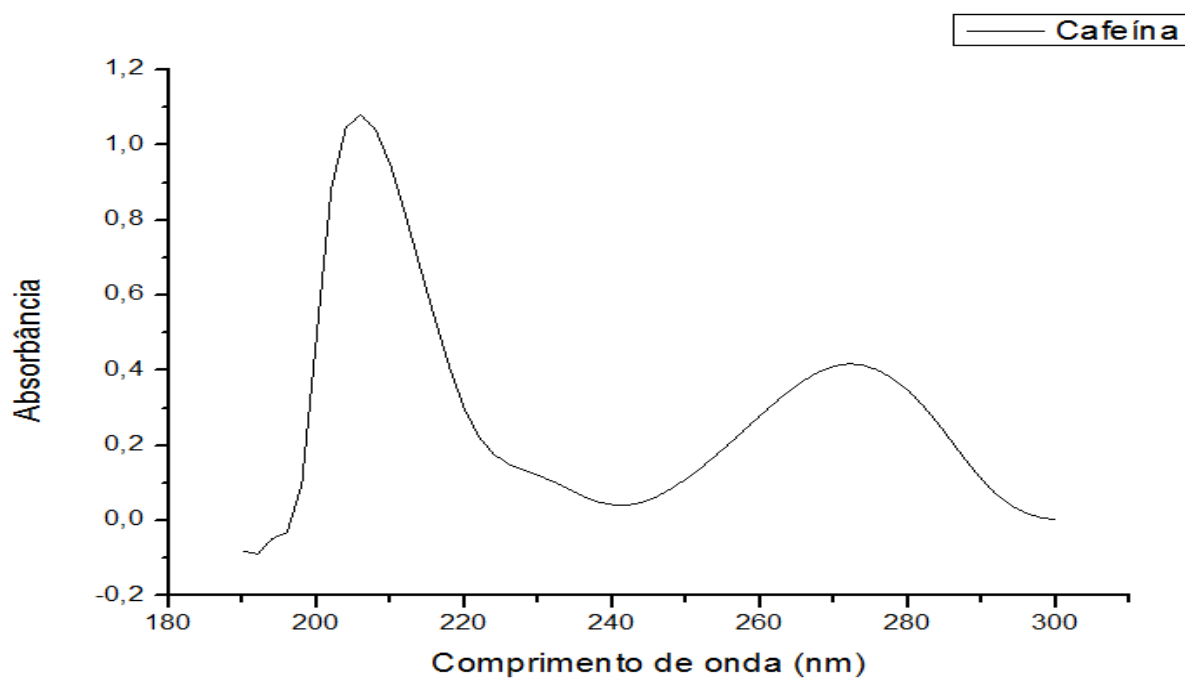


Figura 20: Espectro UV-Vis da cafeína, obtido em uma concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol.

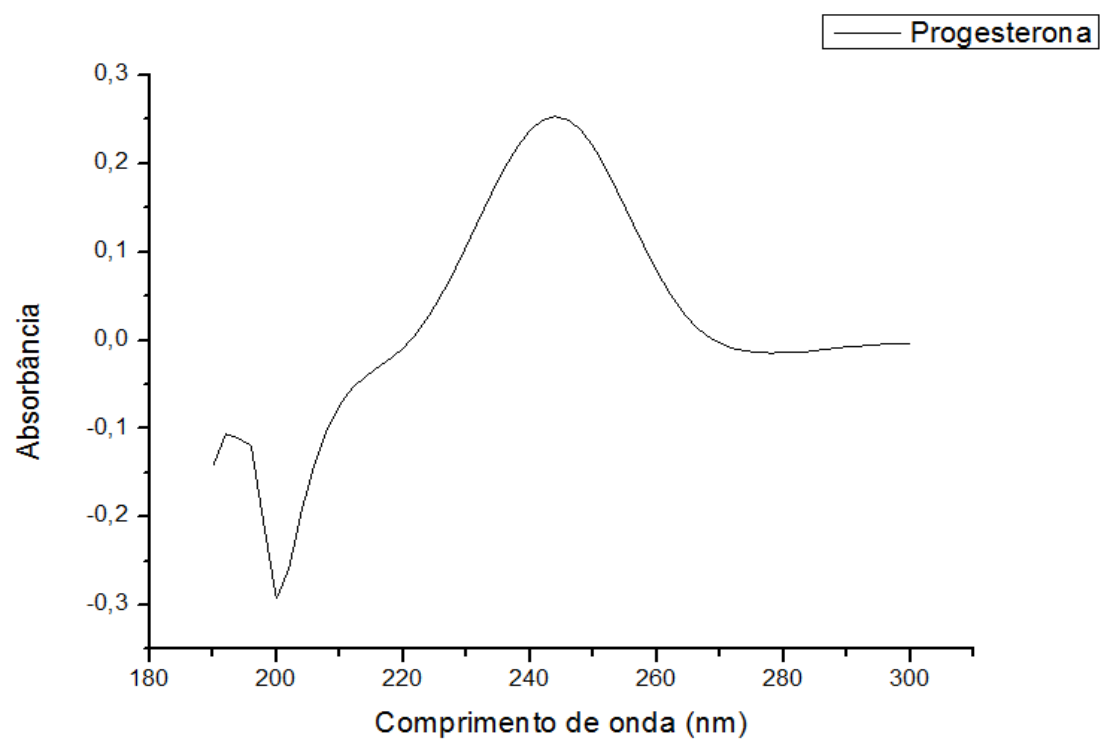


Figura 21: Espectro UV-Vis da progesterona, obtido em uma concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol.

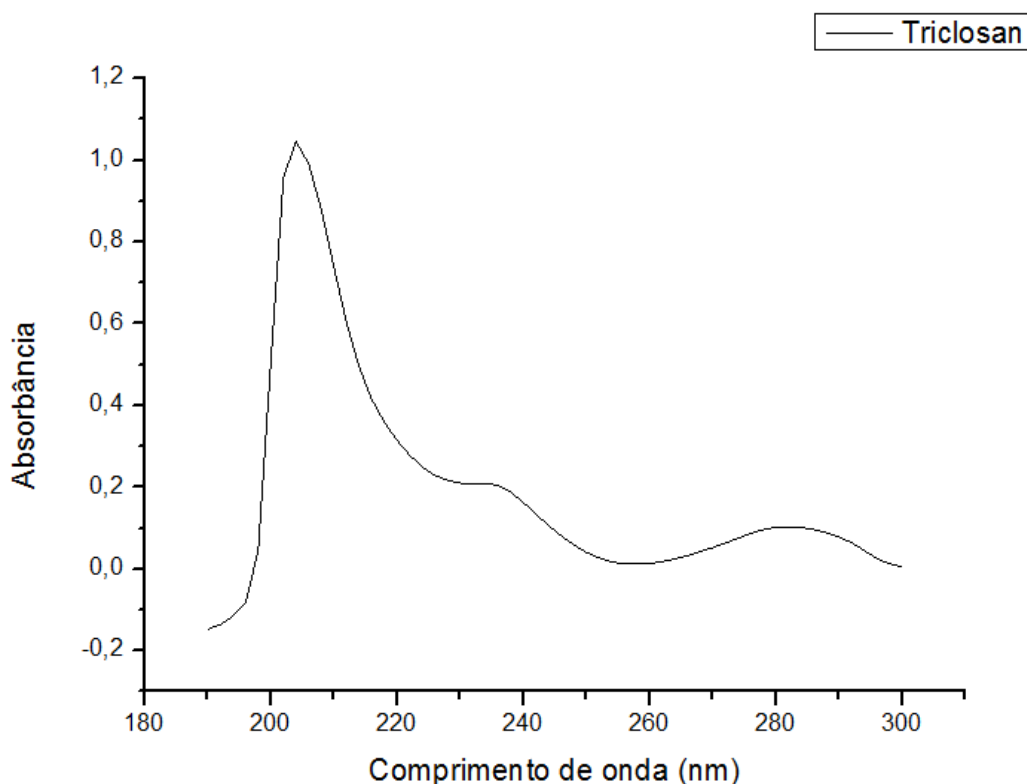


Figura 22: Espectro UV-Vis do triclosan, obtido em uma concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> em metanol.

Como observado nos espectros, a cafeína e o triclosan tem dois e três comprimentos de onda de absorção, respectivamente. Para saber qual o comprimento de onda máximo, deve-se levar em consideração que as substâncias orgânicas, conforme vão sofrendo substituição de grupamentos na molécula, o comprimento de onda vai mudando. A base do triclosan, por exemplo, é um benzeno que sofreu substituição dos hidrogênios por vários grupamentos (haletos, hidroxila e grupamento éter). Nesse caso, o benzeno é considerado como uma molécula cromófora, ou seja, tem uma absorção característica na região do ultravioleta. Esses grupos substituintes são chamados auxocromos, esses grupamentos modificam o comprimento de onda de absorção do cromóforo e a intensidade máxima de absorção. A banda de absorção em aproximadamente 210 nm é correspondente ao benzeno e a outra banda de absorção é correspondente aos grupos auxocromos. Para avaliar o comprimento de onda máximo de uma substância orgânica, deve-se considerar essas variações, por isso o comprimento de onda máximo não é o 210 nm, que corresponde ao benzeno e sim, ou outro comprimento de onda com maior

intensidade, que considera a variação dos grupos auxocromos, considerando toda a molécula (Silverstain et al, 2006).

Além das substituições, deve-se levar em consideração o fato de que várias substâncias absorvem em comprimentos de onda iguais, causando interferência nas análises. Várias substâncias têm absorção máxima em comprimento de onda 210 nm, como exemplo cita-se substâncias com grupos carboxilas e a acetoneitrila, que sendo a fase móvel utilizada nesse trabalho, pode interferir na detecção dessas substâncias, portanto, foi utilizado o outro comprimento de onda, para minimizar as interferências.

Na tabela 3 estão representados os comprimentos de onda máximo obtidos pelos espectros de UV-Vis.

Tabela 3: Comprimentos de onda de absorção dos analitos estudados

Analito	Comprimento de onda (nm)
Atrazina	222
Cafeína	272
Progesterona	240
Triclosan	280

## 4.2 Otimização das condições cromatográficas

Com o objetivo de separar os analitos e obter uma boa resolução, a corrida cromatográfica foi feita com eluição por gradiente, baseando-se no artigo de Montagner & Jardim (2011). Como não foi possível observar a presença de todos os analitos, o método foi sendo modificado nas proporções das fases móveis para obter-se uma melhor resolução e maiores picos.

A figura 23 mostra o melhor cromatograma obtido nos testes preliminares:

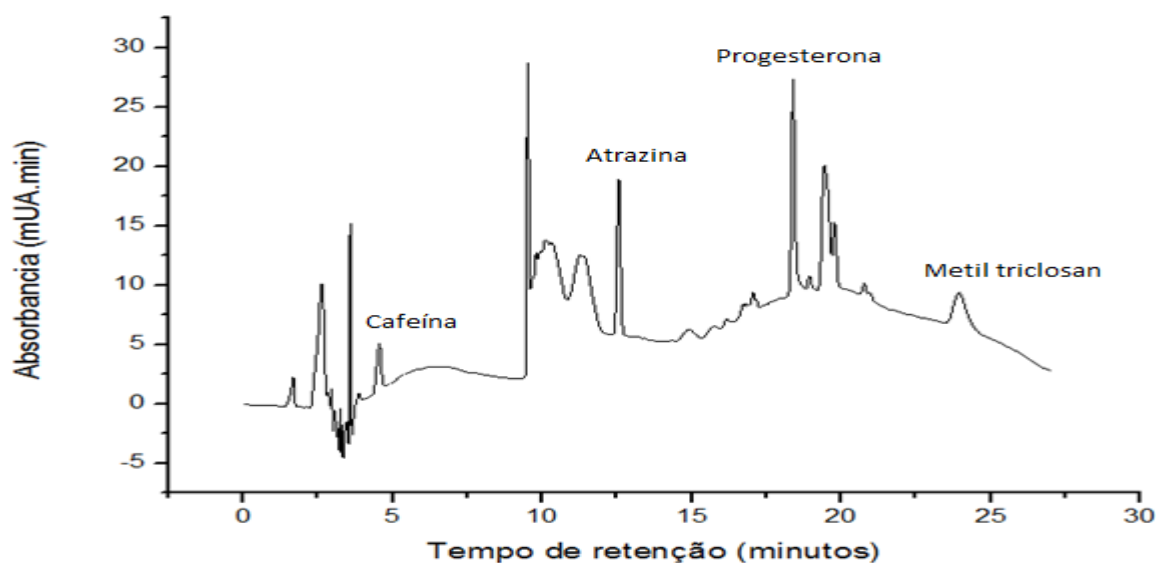


Figura 23: Cromatograma dos padrões com concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , vazão da fase móvel  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna  $26^\circ \text{ C}$ , eluição gradiente com água/ acetonitrila (20%, 60% e 80% de ACN) em  $\lambda = 272 \text{ nm}$ .

O cromatograma da figura 23, mostra a detecção das quatro substâncias analisadas, os tempos de retenção com seus respectivos valores de absorbância em mUA (mili- unidades de área). Foi possível notar que o tempo total de corrida foi 30 minutos. Nos primeiros testes, um dos analitos era o metil-triclosan, que posteriormente foi substituído pelo triclosan, pois a identificação é facilitada pela maior polaridade do triclosan, comparado ao metil-triclosan, com isso a interação com a coluna é menor, o que faz com que o pico seja melhor resolvido.

Como o cromatograma não apresentou uma linha de base estável e ao mesmo tempo, apareceram muitos picos não identificados (um com alta área de pico em aproximadamente 10 minutos), resolveu-se testar novas proporções de fase móvel para diferentes tempos da corrida.

Na figura 24, foi utilizado o mesmo método para obtenção dos cromatogramas em dois dias diferentes. Foram feitas oito análises em cada um dos dois dias e em todas as análises os cromatogramas ficaram como os representados a seguir.

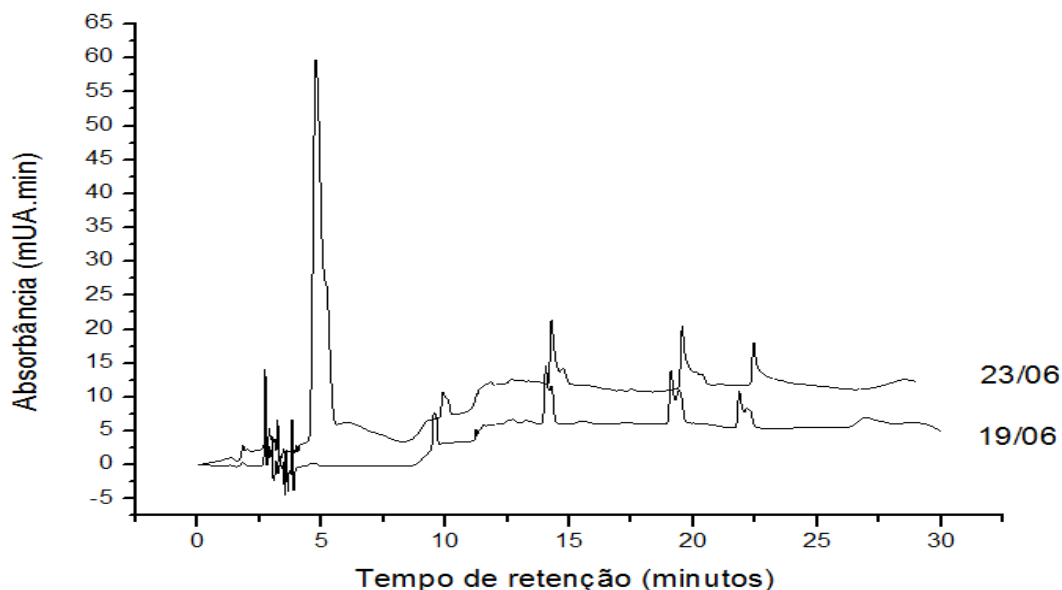


Figura 24: Cromatograma dos padrões com concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , utilizando a temperatura da coluna  $26^\circ \text{C}$ , com vazão da fase móvel de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , com eluição por gradiente dos solventes água e acetonitrila (ACN 10%, 30%, 60%, 70%, 90%) em  $\lambda = 272 \text{ nm}$ .

Pelo cromatograma percebe-se que há um pico em aproximadamente cinco minutos no dia 23/06, que não apareceu no dia 19/06. Também pode-se ver que os tempos de retenção dos analitos mudaram um pouco, mas a principal diferença é o formato dos picos, que no dia 19/06 três deles aparecem duplicados, e dia 23/06 os picos ficaram pouco simétricos e com caudas. Essa duplicação pode acontecer por haver uma obstrução na entrada da coluna, fazendo com que uma porção da amostra siga o caminho atrasada, em relação à outra porção que está seguindo o caminho normal, a porção que está atrasada chega como cauda no pico cromatográfico, podendo também formar ombros ou duplicações, dependendo da extensão da obstrução (Neto, 2009)

Nesse momento, viu-se que era necessário a troca da coluna, visto que o pico do solvente em aproximadamente cinco minutos, está muito alto, indicando interferência (a coluna C18 Varian® foi trocada por uma C18 Khromatex®).

Com a troca da coluna, foram testados alguns métodos anteriormente utilizados, com pequenas modificações e obteve-se o cromatograma da figura 25:



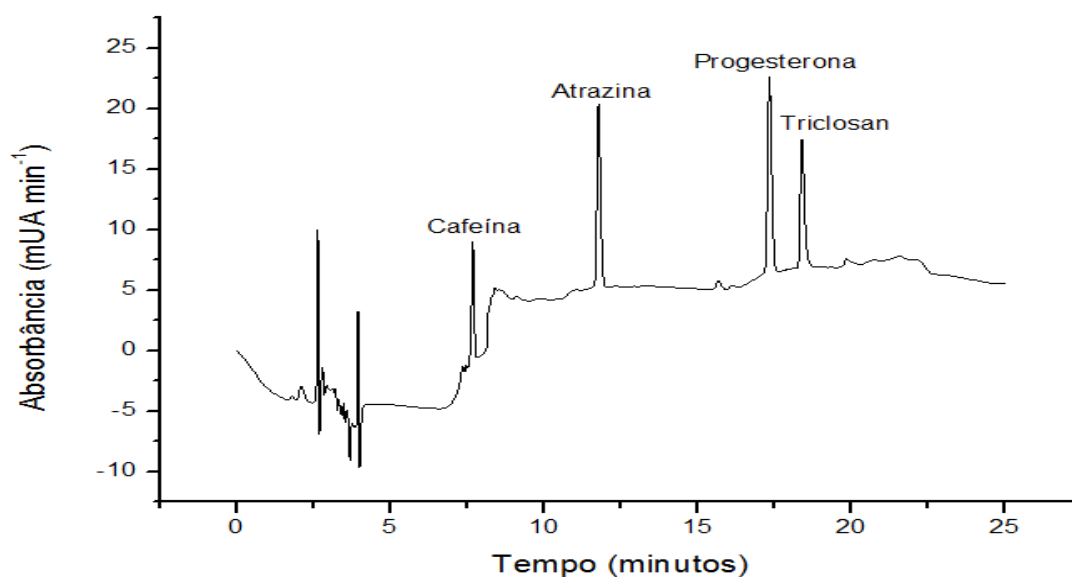
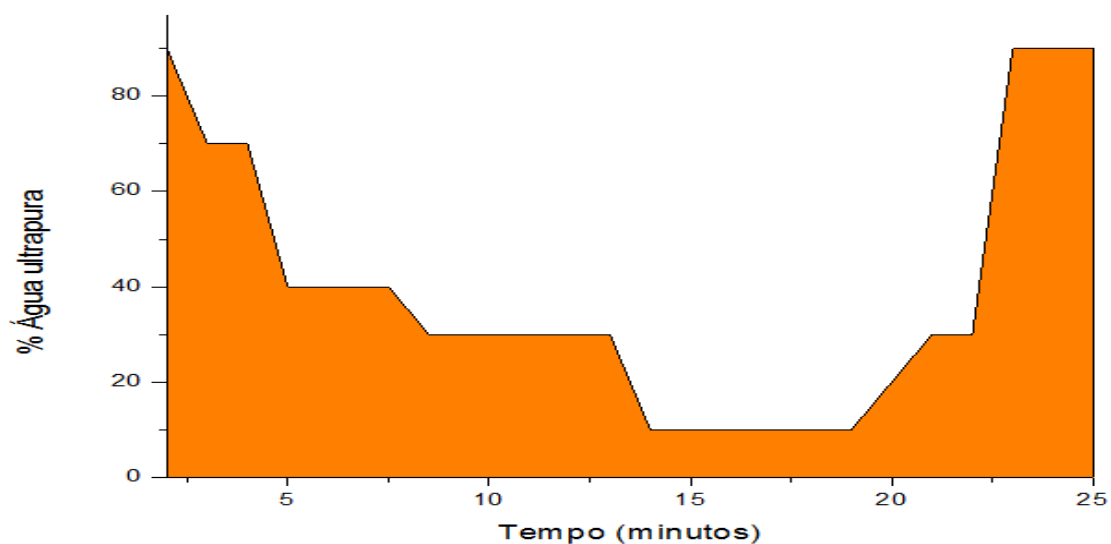


Figura 25: Cromatograma dos padrões na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , temperatura da coluna  $26^\circ \text{ C}$ , e eluição por gradiente em uma vazão de  $1 \text{ mL/min}$ , com solventes acetonitrila/água, começando com 10% de acetonitrila, passando para 30%, 70%, 90%) em  $\lambda = 272 \text{ nm}$ .

Na figura 25, consta o cromatograma obtido após a troca da coluna. O tempo total da corrida cromatográfica foi 25 minutos, a ordem de saída dos analitos da coluna foi: cafeína (7,7 minutos), atrazina (11,4 minutos), progesterona (17,3 minutos) e triclosan (18,1 minutos)

Como o ruído está baixo, não há interferências e os picos ficaram simétricos e bem resolvidos, o método de análise escolhido é o que obteve esse cromatograma, cujas proporções da fase móvel (água ultrapura e acetonitrila) de acordo com o tempo de análise estão expostas no gráfico abaixo:

Figura 26: Gráfico com as proporções das fases móveis da corrida cromatográfica



A descrição das proporções da fase móvel contidas no gráfico, encontram-se abaixo:

0 – 2 minutos: 90% água ultrapura e 10% de acetonitrila (ACN)

2 – 3 minutos: 70% água ultrapura e 30% de ACN, mantida até 4 minutos

4 – 5 minutos: 40% água ultrapura e 60% de ACN, mantida até 7,5 minutos

7,5 – 8,5 minutos: 30% água ultrapura e 70% de ACN, mantida até 13 minutos

13 – 14 minutos: 10% água ultrapura e 90% de ACN, mantida até 19 minutos

19 – 21 minutos: 30% água ultrapura e 70% de ACN, mantida até 22 minutos

22 – 23 minutos: 90% água ultrapura e 10% de ACN, mantida até 25 minutos

Foram feitas análises com diferentes temperaturas e diferentes vazões da fase móvel. Os cromatogramas encontram-se nas figuras 27, 28, 29 e 30:

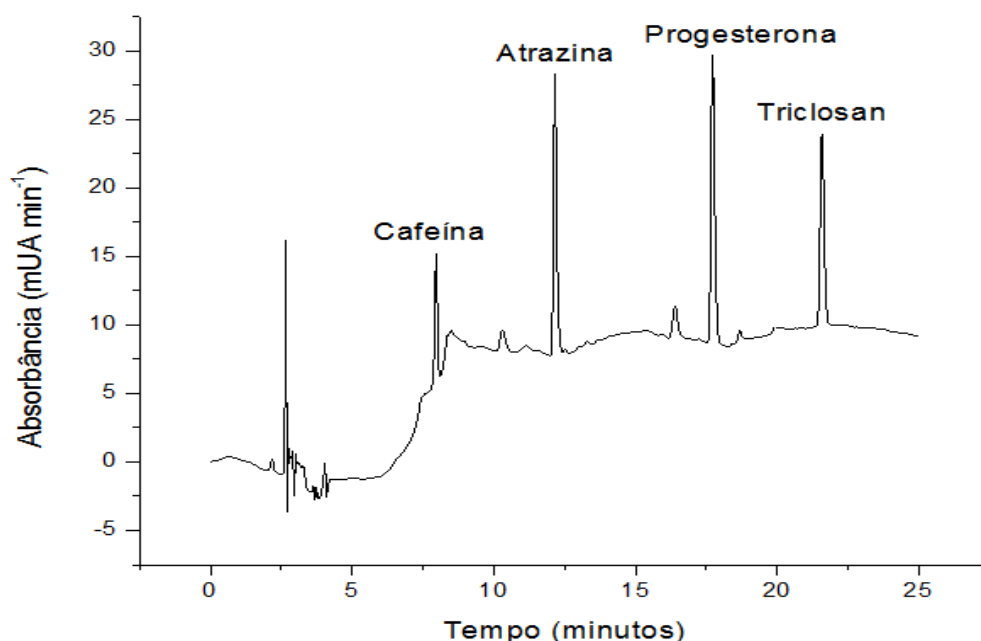


Figura 27: Cromatograma obtido para os padrões de concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , com a temperatura da coluna em  $21^\circ \text{C}$ , vazão da fase móvel de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e eluição gradiente conforme figura 23, em  $\lambda = 272 \text{ nm}$ .

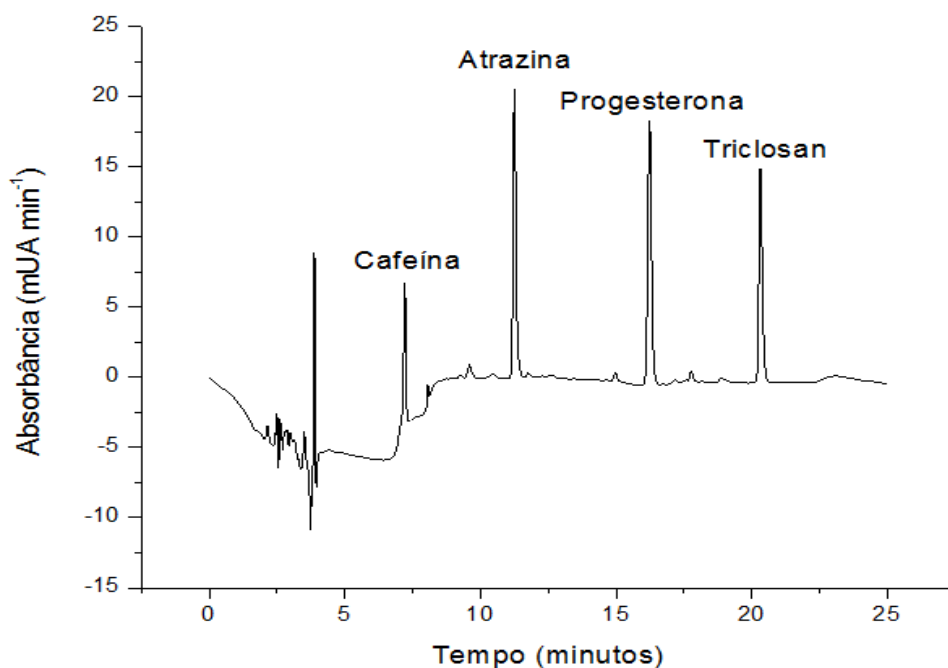


Figura 28: Cromatograma obtido para os padrões de concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , com a temperatura da coluna em  $30^\circ \text{ C}$ , vazão da fase móvel de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e eluição por gradiente conforme figura 23, em  $\lambda = 272 \text{ nm}$ .

Nas figuras 27 e 28 pode-se observar os cromatogramas obtidos com temperatura da coluna em  $21^\circ \text{ C}$  e em  $30^\circ \text{ C}$ , respectivamente. Quando comparados ao cromatograma da figura 4, em que a temperatura da coluna foi  $26^\circ \text{ C}$ , percebe-se que não houve variação nos tempos de retenção (e consequentemente no tempo de corrida), e a absorbância de cada um dos analitos teve uma mudança muito pequena em termos de valores. Visto que não há diferença nas áreas dos picos nem nos tempos de retenção dos analitos, a temperatura escolhida para análises posteriores foi  $26^\circ \text{ C}$ , pois a temperatura influencia no fator de retenção dos analitos.

O fator de retenção é a razão entre a quantidade de moléculas que permanecem na fase estacionária ou percolando a fase móvel e também a razão entre o tempo que as moléculas permanecem em cada fase. Esse fator é calculado pela equação de Van Hoff:

$$\ln(k) = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R + \ln(\beta) \quad \text{Equação 1}$$

onde  $\beta$  é a razão entre as fases,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  são as entalpias e entropias de retenção,  $T$  é a temperatura em K e  $R$  é a constante dos gases.

As bases e algumas outras moléculas tem seus tempos de retenção alterados significativamente diante da mudança de temperatura e o fator de retenção diminui significativamente quanto maior a temperatura (Borges, Bottoli, Carla, Collins, 2010).

Além do fator de retenção, deve-se considerar também a eficiência da cromatografia, que é baseada no número de pratos teóricos ou altura dos pratos. A altura do prato é calculada em função da velocidade linear que é expressa pela equação de Van Deemter:

$$H = A + B/u + Cu \quad \text{Equação 2}$$

Onde: A é dependente dos caminhos múltiplos percorridos pelo soluto, B é dependente da difusão longitudinal do soluto e C é dependente da transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária. Quando a altura do prato tem seu valor mínimo, significa que a velocidade é linear, e essa velocidade é denominada velocidade linear ótima. A curva de Van Deemter mostra que a 25° C, a velocidade linear é ótima, quando aumenta-se a temperatura, o valor de C diminui, aumentando assim a altura do prato teórico (Borges & Bottoli, Carla B; Collins, 2010), por esses dois motivos, a temperatura de 30° C não foi escolhida e pela curva de Van Deemter mostrar que a altura do prato teórico e a velocidade linear também é ótima a 25° C, foi utilizada a temperatura de 26° C.

Nas figuras 29 e 30, podemos observar os cromatogramas obtidos com vazões de fase móvel de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e 1,2 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Comparando com a figura 4, que contém o cromatograma que foi obtido com uma vazão de fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, percebemos que quando maior a vazão da fase móvel, mais rápida é a corrida e os valores da absorbância não mudam significativamente. Mantendo a vazão em 1,2 mL min<sup>-1</sup>, a pressão da coluna subiu muito (quase 200 psi), por esse motivo, a vazão escolhida foi 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

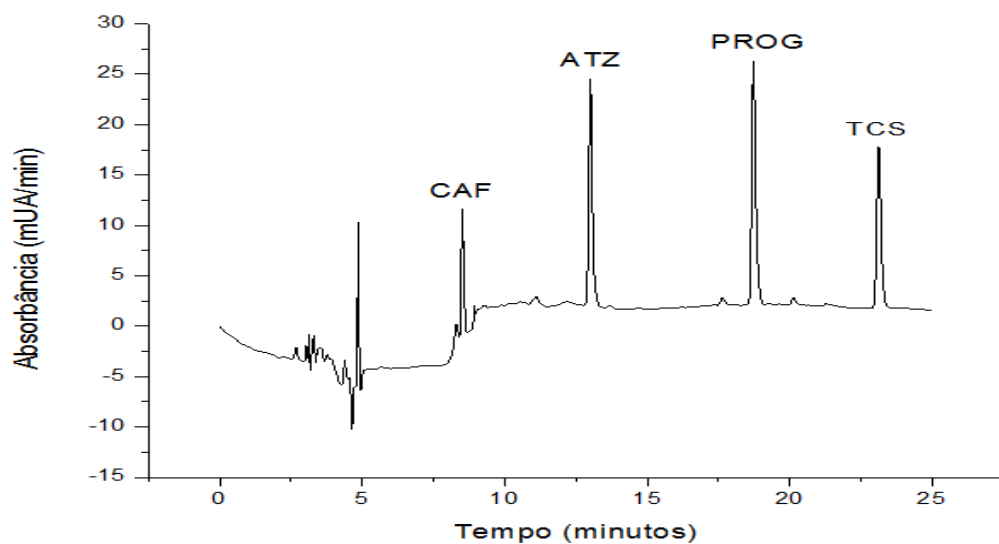


Figura 29: Cromatograma obtido para os padrões de concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , com a temperatura da coluna em  $26^\circ \text{ C}$ , vazão da fase móvel de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e eluição por gradiente conforme figura 23, em  $\lambda = 272 \text{ nm}$ .

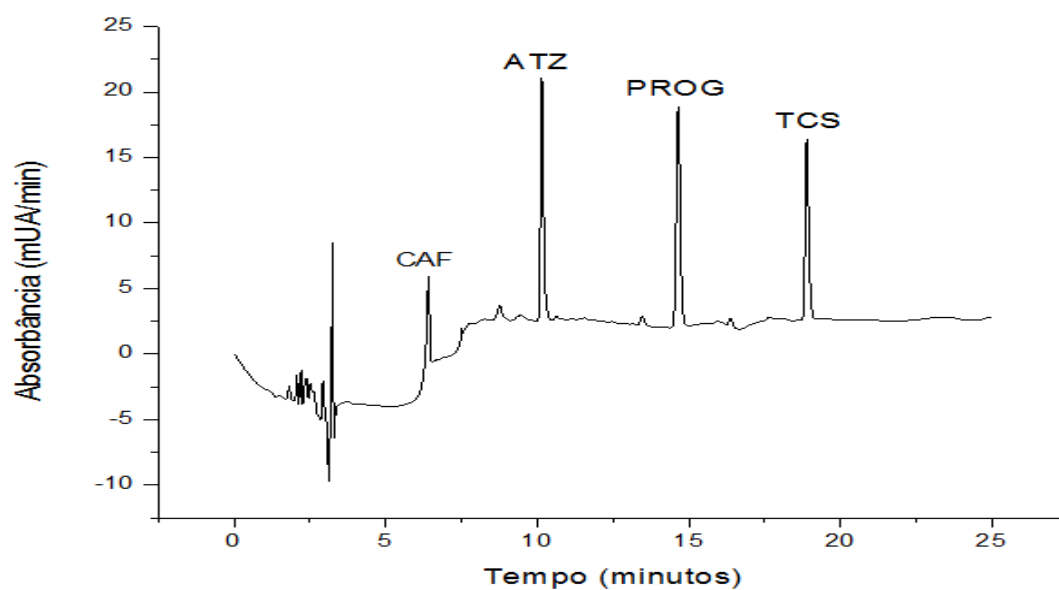


Figura 30: Cromatograma obtido para os padrões de concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , com a temperatura da coluna em  $26^\circ \text{ C}$ , vazão da fase móvel de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  e eluição por gradiente conforme figura 23, em  $\lambda = 272 \text{ nm}$ .

Com base nos cromatogramas das figuras 29 e 30, percebe-se que o tempo de corrida em uma vazão de fase móvel de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  aumenta. Portanto a vazão escolhida foi  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , visto que aumentando-se a vazão,

aumenta-se muito a pressão da coluna, podendo prejudicar as análises posteriores por danificar a fase estacionária.

### 4.3 CURVA ANALÍTICA

Foi feita uma curva analítica, diluindo-se a mistura de padrões, em triplicata, de acordo com a tabela de faixas de concentração abaixo:

Tabela 4: faixas de concentração dos analitos na curva analítica

Atrazina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cafeína ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Progesterona ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Triclosan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
5- 150	30- 150	5- 150	30- 150

As curvas analíticas para cada um dos padrões, estão representadas nas figuras 31, 32, 33 e 34:

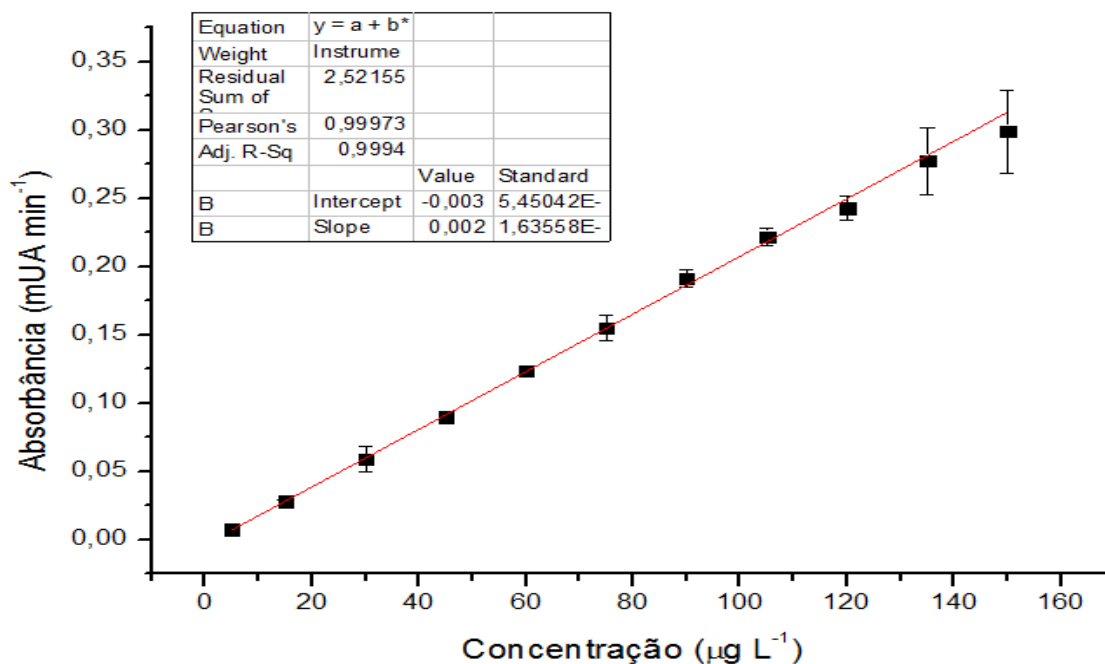


Figura 31: Curva analítica de uma solução padrão de atrazina, na faixa de concentração de 5 – 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol grau HPLC.

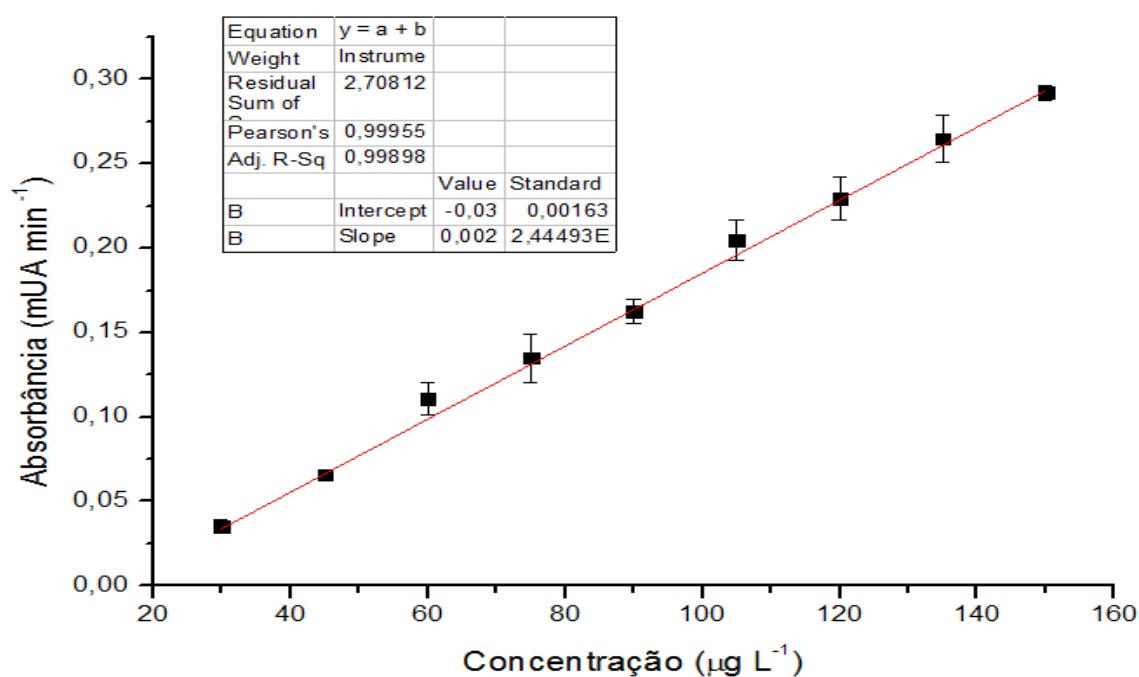


Figura 32: Curva analítica de uma solução padrão de cafeína, na faixa de concentração de 30 – 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol grau HPLC.

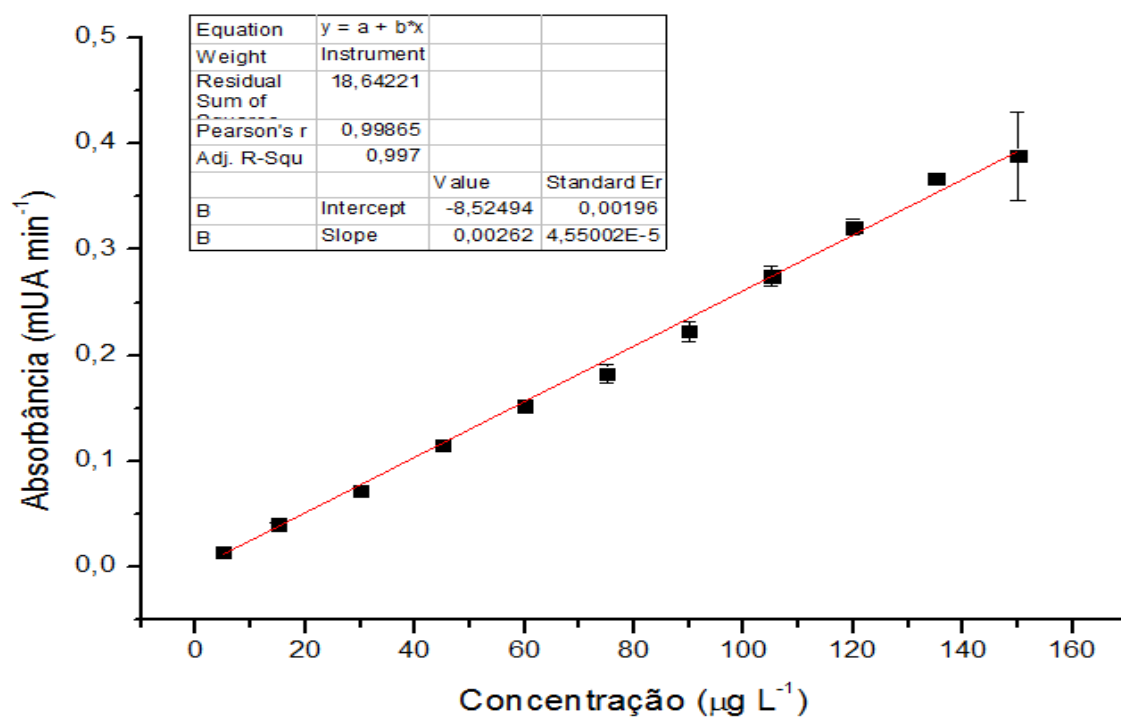


Figura 33: Curva analítica de uma solução padrão de progesterona, na faixa de concentração de 5 – 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol grau HPLC.

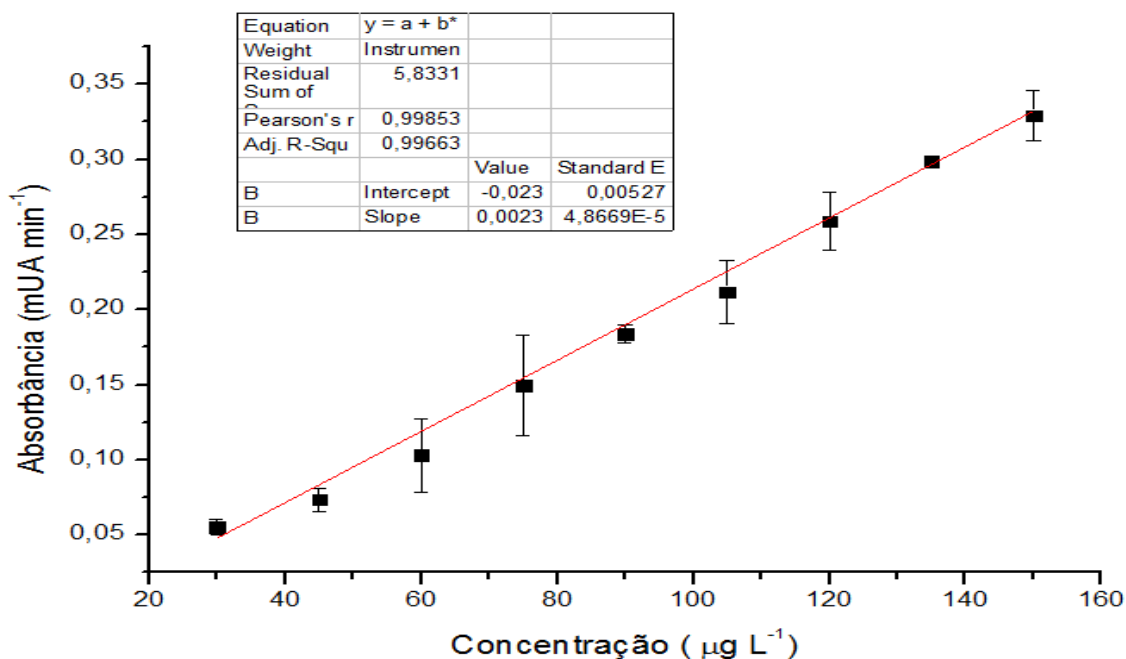


Figura 34: Curva analítica de uma solução padrão de triclosan, na faixa de concentração de 30 – 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol grau HPLC.

Através das curvas analíticas, foi possível encontrar o erro relativo de cada concentração. No gráfico, através do programa Origin Pro 8.0, verificou-se o valor da absorbância. Esse valor é substituído na equação da reta, e encontrado o valor da concentração medida pelo equipamento. A partir dos valores de concentração experimental (medida pelo equipamento) e concentração obtida através da equação da reta da curva analítica, foi calculado o erro relativo, através da fórmula: Erro relativo= (Valor experimental- valor real) / valor real.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), foram obtidos baseando-se no método oficial da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) pela fórmula a seguir:

$\text{LOD} = 3,3 \times s/S$ , onde  $s$ = estimativa do desvio padrão do branco e  $S$ = coeficiente angular da curva analítica (slope), e  $\text{LOQ} = 10 \times s/S$ , onde  $s$ = estimativa do desvio padrão do branco e  $S$ = coeficiente angular da curva analítica (para a estimativa do desvio padrão do branco, foram utilizadas 7 replicatas do solvente em que os padrões foram dissolvidos, ou seja, metanol).



A tabela 5 mostra os valores dos parâmetros de mérito encontrados através das curvas analíticas, calculados como mostrado anteriormente:

Tabela 5: Parâmetros de mérito obtidos através das curvas analíticas

ANALITO	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ )
Atrazina	5,29	17,65	0,9994
Cafeína	11,82	39,39	0,9989
Progesterona	7,00	23,35	0,9970
Triclosan	4,79	15,98	0,9966

Os resultados de Rodríguez-González et.al (2014), tiveram valores de limites de detecção e quantificação um pouco inferiores que os encontrados nesse trabalho para a atrazina. Os resultados de (Peysson & Vulliet, 2013) tiveram valores de limites de detecção e quantificação acima dos limites encontrados nesse trabalho para a progesterona e triclosan.

Na tabela 7, estão os valores dos erros relativos de cada um dos analitos, calculado para três ou quatro concentrações. A curva analítica da cafeína e do triclosan começam em  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , por isso não foi calculado o erro relativo em  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada um desses analitos.

Tabela 6: Erros relativos (%) para todos os analitos, em três concentrações

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Atrazina	Cafeína	Progesterona	Triclosan
20	18	-	20	-
55	17	7	-16	-17
85	-8	15	-3	5
115	4	-9	5	-13

Na tabela 7, encontram-se os resultados para os coeficientes de variação em três concentrações para cada um dos analitos, calculados para a menor concentração da curva analítica, uma concentração intermediária e a maior concentração da curva analítica:

Tabela 7: Coeficientes de variação dos analitos, mostrados para a menor concentração da curva analítica, uma concentração intermediária e a maior concentração.

	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de variação (%)
Atrazina	5	22
	75	6
	150	10
Cafeína	15	13
	90	6
	150	2
Progesterona	5	16
	75	5
	150	11
Triclosan	15	6
	90	3
	150	5

Os erros relativos ficaram abaixo de 25%, indicando uma boa repetibilidade do método.

Os coeficientes de variação (que mostram a precisão em função da repetibilidade do método) ficaram abaixo de 25%, indicando que o método é preciso, ou seja, a dispersão dos resultados entre os ensaios em uma mesma amostra é baixa.

Os coeficientes de correlação e estimativas de desvio padrão estão bem próximos ou acima de todos os trabalhos encontrados.

Os índices de correlação ficaram acima de 0,995, que é recomendado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) e pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) e confere uma boa linearidade ao método.

Todos os parâmetros analisados para a curva analítica ficaram dentro do recomendado, indicando que o método é confiável e pode ser utilizado para determinar cafeína, atrazina, progesterona e triclosan.

#### 4.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Na figura 35, observamos o cromatograma obtido para um dos testes da extração com cartucho C18:

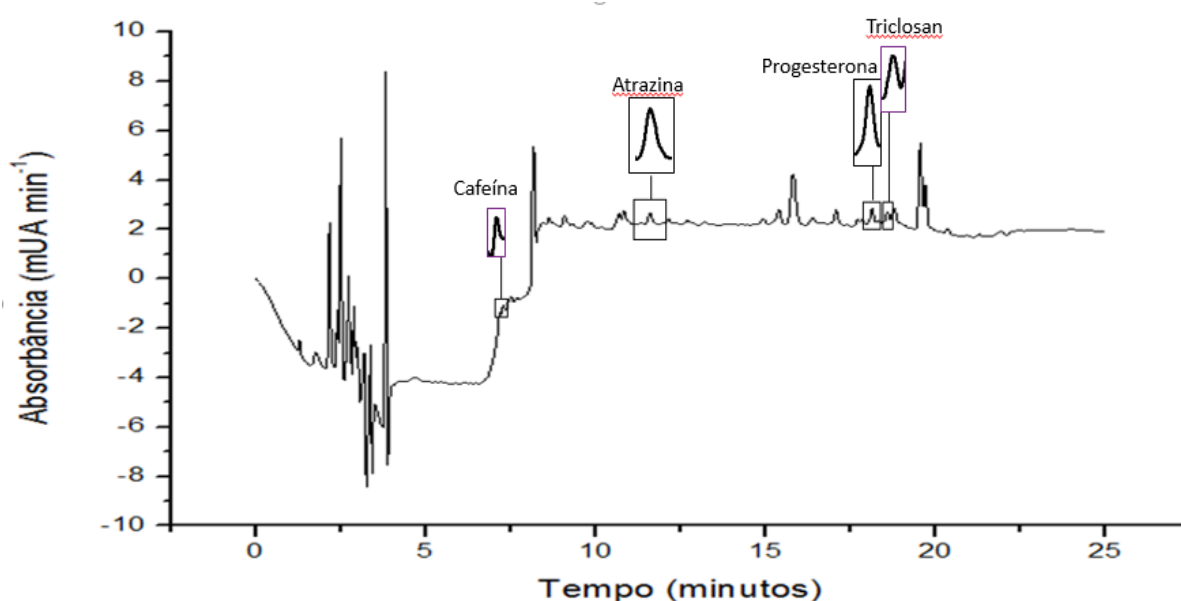


Figura 35: Cromatograma obtido para o teste de extração com cartucho C18, com vazão dos padrões de 4 mL min<sup>-1</sup> e eluição com solvente metanol

Na figura 35, consta o cromatograma obtido após o teste de extração que foi feito com uma vazão de 4 mL min<sup>-1</sup> e eluição com metanol, essas condições foram as que se obteve melhores resultados de recuperação.

A amostra inicial tinha concentração de 0,1 µg L<sup>-1</sup>, foi concentrada 667 vezes, obtendo-se assim, uma solução de 66,7 µg L<sup>-1</sup>. A recuperação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{valor obtido} / \text{valor adicionado}) * 100$$

Na tabela 8, encontram-se os melhores resultados obtidos para recuperação com cartucho de fase extratora C18:

Tabela 8: Resultados de recuperação dos analitos com cartucho C18

Analito	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
Atrazina	99	11
Cafeína	78	21
Progesterona	87	9
Triclosan	37	16

Essas recuperações foram obtidas nas seguintes condições:

Vazão: 4 mL min<sup>-1</sup>

Solvente: Metanol

Pela tabela 8, percebemos que atrazina, cafeína e progesterona tiveram recuperações na faixa de 78 a 99%, que está dentro da faixa recomendada para recuperações de analitos em níveis traço e ultra-traço, cujos valores são de 70% a 120%. Somente para o triclosan, o resultado obtido ficou abaixo do esperado porque é o único analito que possui o Kow maior que 4, ou seja, é o único analito hidrofóbico, com isso, ele fica fortemente retido no cartucho e como a polaridade é bem diferente da polaridade do solvente de eluição, que é polar, a maioria das moléculas do analito ficam retidas no cartucho e não são eluídas.

Na tabela 9, encontram-se os valores de recuperação obtidos com cartucho C18 nas outras condições testadas:

Tabela 9: Recuperações obtidas com cartucho C18 para as outras condições testadas

	4 mL min <sup>-1</sup> MeOH/ACN (%)	5 mL min <sup>-1</sup> MeOH/ACN (%)	5 mL min <sup>-1</sup> MeOH (%)	6 mL min <sup>-1</sup> MeOH/ACN (%)	6 mL min <sup>-1</sup> MeOH (%)
Atrazina	48	65	32	14	104
Cafeína	95	94	84	81	61
Progeste- rona	18	16	23	14	171
Triclosan	184	158	67	68	78

Também foram feitos testes, com cartuchos de extração da marca HLB, que consiste em uma fase estacionária polimerizada de poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona), tem um equilíbrio lipofílico-hidrofílico, ou seja, pode ser utilizado para compostos ácidos, básicos e neutros, além de poder ser utilizado em diversos tipos de matrizes.

Na figura 36, observamos o cromatograma obtido para um dos testes da extração com cartucho HLB:

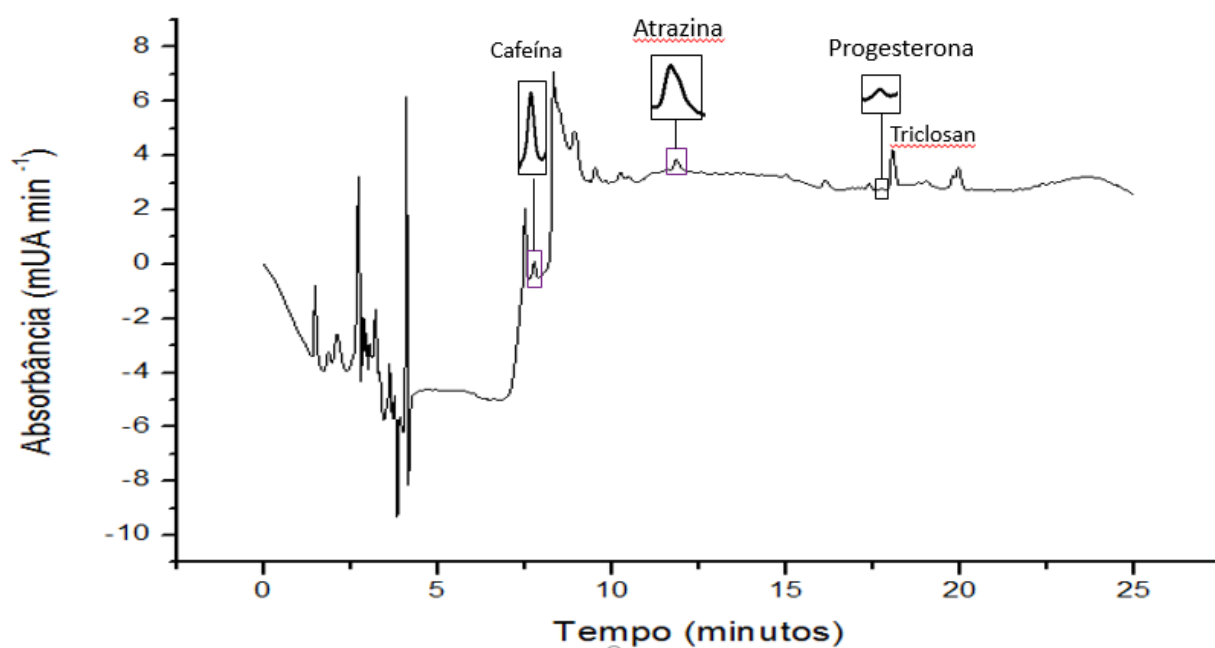


Figura 36: Cromatograma obtido para o teste de extração com cartucho HLB, com vazão dos padrões de 5 mL min<sup>-1</sup> e eluição com solventes metanol/acetonitrila.

Na figura 36, consta o cromatograma obtido após o teste de extração que foi feito com uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup> e eluição com metanol, essas condições foram as que se obteve melhores resultados de recuperação. No cromatograma, é possível visualizar os picos da atrazina, cafeína, progesterona e triclosan nos tempos de retenção dos padrões, apesar da concentração ser baixa.

A amostra inicial tinha concentração de 0,1 µg L<sup>-1</sup>, foi concentrada 667 vezes, obtendo-se assim, uma solução de 66,7 µg L<sup>-1</sup>. A recuperação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{valor obtido} / \text{valor adicionado}) * 100$$

Na tabela 10, encontram-se os melhores resultados obtidos para recuperação com cartucho HLB:

Tabela 10: Resultados de recuperação dos analitos com cartucho HLB

Analito	Recuperação (%)	Coeficiente de variação (%)
Atrazina	64	19
Cafeína	88	23
Progesterona	21	20
Triclosan	120	12

Essas recuperações foram obtidas nas seguintes condições:

Vazão: 5 mL min<sup>-1</sup>

Solventes: Metanol/ acetonitrila

Pela tabela 10 percebemos que as recuperações da atrazina e progesterona ficaram abaixo do recomendado, que é na faixa de 70% a 120%.

Na tabela 11, encontram-se os valores de recuperação obtidos com cartucho HLB para as outras condições estudadas:

Tabela 11: Recuperações obtidas com cartucho HLB para as demais condições testadas

	4 mL min <sup>-1</sup> MeOH/ACN (%)	4 mL min <sup>-1</sup> MeOH (%)	5 mL min <sup>-1</sup> MeOH (%)	6 mL min <sup>-1</sup> MeOH/ACN (%)	6 mL min <sup>-1</sup> MeOH (%)
Atrazina	48	48	54	37	55
Cafeína	108	108	57	12	43
Progestero na	22	22	12	30	13
Triclosan	72	72	61	46	60

#### 4.5 Análise das águas de abastecimento público e de rios

Depois de terminados os testes de extração, foi decidido que para as amostras, o cartucho a ser utilizado seria o C18, já que com essa fase, foram obtidas boas taxas de recuperação para três, dos quatro analitos.

Para o cálculo das concentrações dos analitos nas amostras, foi necessário calcular os limites de detecção e quantificação para o método analítico com a extração. O fator de concentração da amostra pela extração em fase sólida foi de 667, portanto, foi necessário dividir os limites de detecção e quantificação por esse valor, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 12: Limites de detecção e quantificação para o método após a extração

	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )
Atrazina	7,93	26,5
Cafeína	17,7	59,0
Progesterona	10,5	35,0
Triclosan	7,18	23,9

Primeiramente, foi feita uma coleta de água da torneira, extração com cartucho C18 nas condições otimizadas para o mesmo, em triplicata. Antes da análise da amostra foi feito um branco, para verificar as condições da coluna, o cromatograma está representado na figura 37:

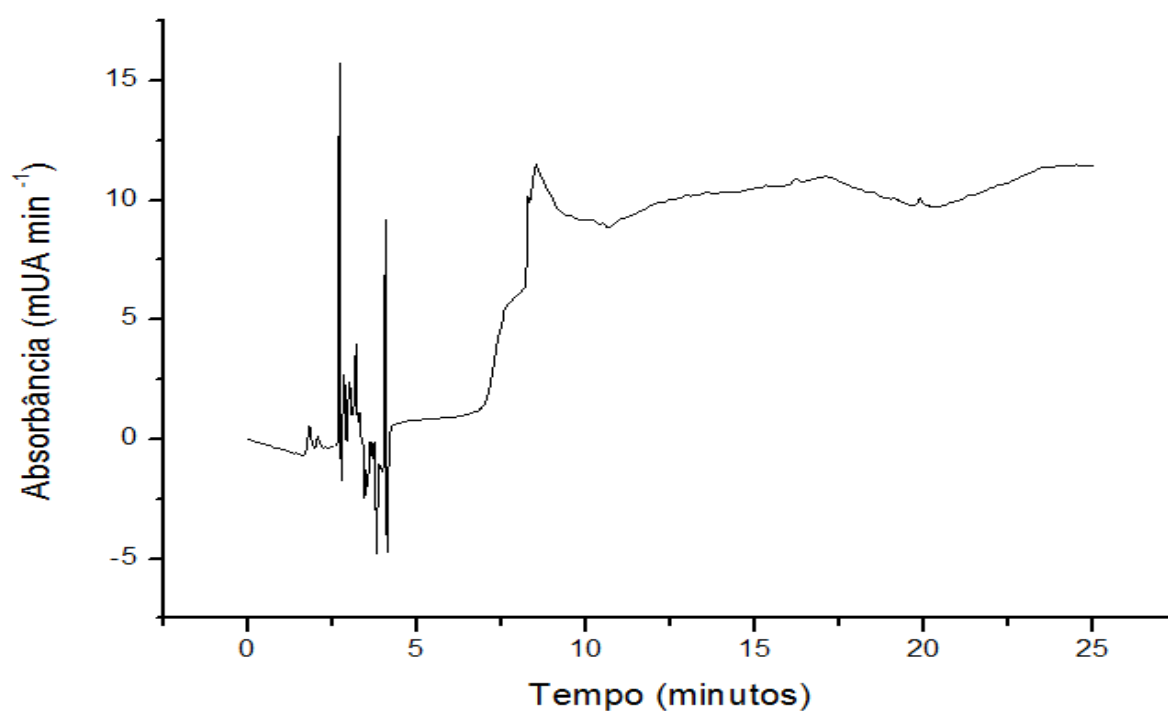


Figura 37: Cromatograma obtido para o solvente, ou branco (metanol) no dia 19/04/2016, com uma coluna C18, com fase móvel acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup> em uma temperatura de 26° C em  $\lambda=240$  nm.



O cromatograma obtido para a amostra de água de abastecimento público está representado na figura 38:

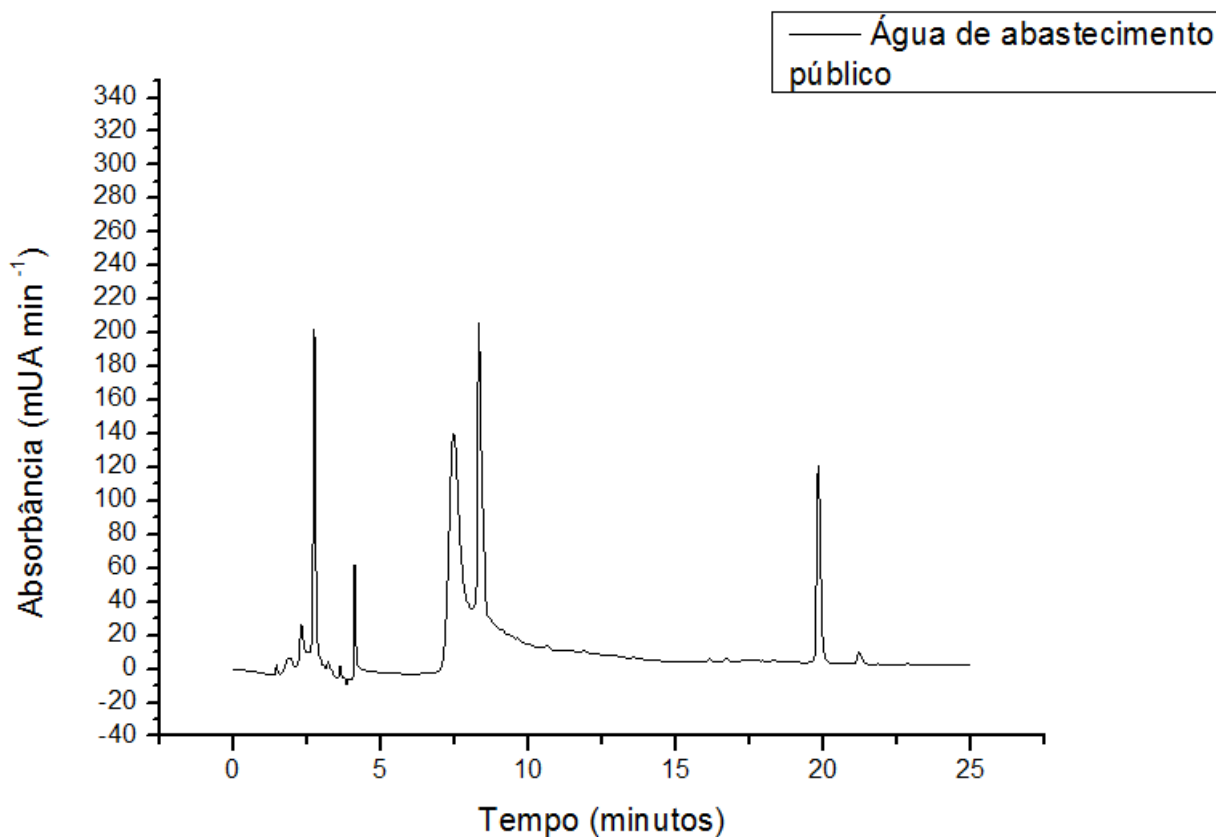


Figura 38: Cromatograma obtido para a amostra de água de abastecimento público, com extração em cartucho C18, com vazão de 4mL min<sup>-1</sup> e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel Acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup> em uma temperatura de 26° C em  $\lambda=240$  nm.

Nenhum dos analitos foi detectado nessa amostra pelo fato dos analitos não estarem presentes, ou estarem em concentrações abaixo dos limites de detecção de cada um deles.

A última etapa do trabalho foi a análise da água dos três rios, coletada em 27/04/2016. Foi feita a extração com cartucho C18, em triplicata, e a análise em HPLC, conforme a metodologia dos padrões. Antes da análise foi feita uma corrida do solvente para verificar as condições da coluna cromatográfica e o cromatograma está representado na figura 39:

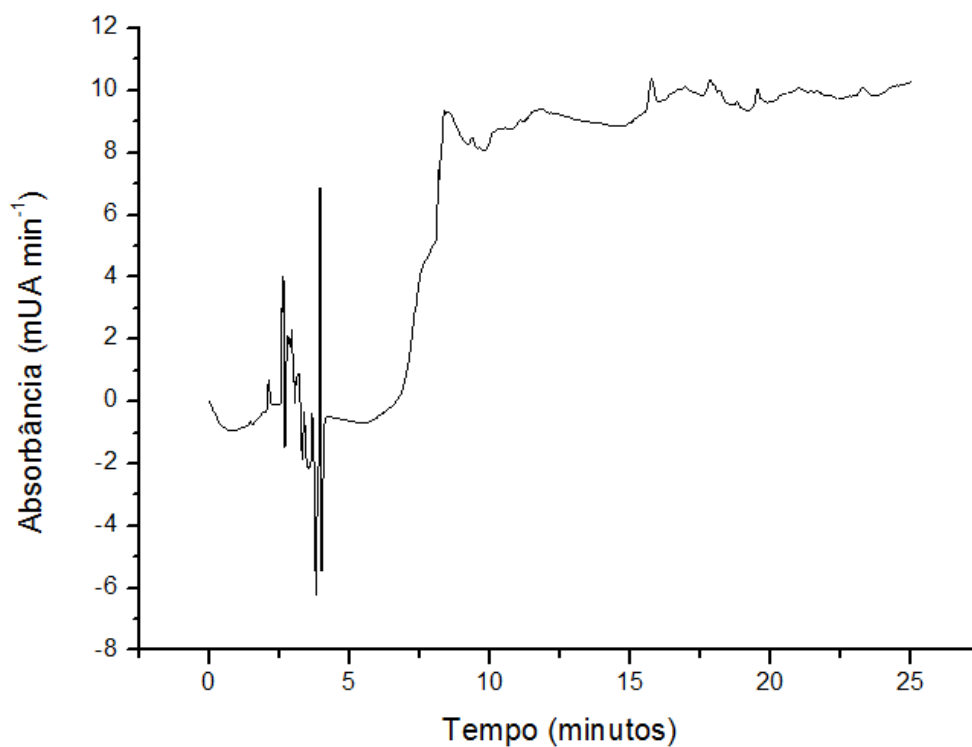


Figura 39: Cromatograma obtido para o solvente, ou branco (metanol) no dia 09/05/2016, com uma coluna C18, com fase móvel acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup> em uma temperatura de 26° C em  $\lambda=240$  nm.

Os cromatogramas obtidos para as amostras dos rios estão representados nas figuras 40, 41 e 42:

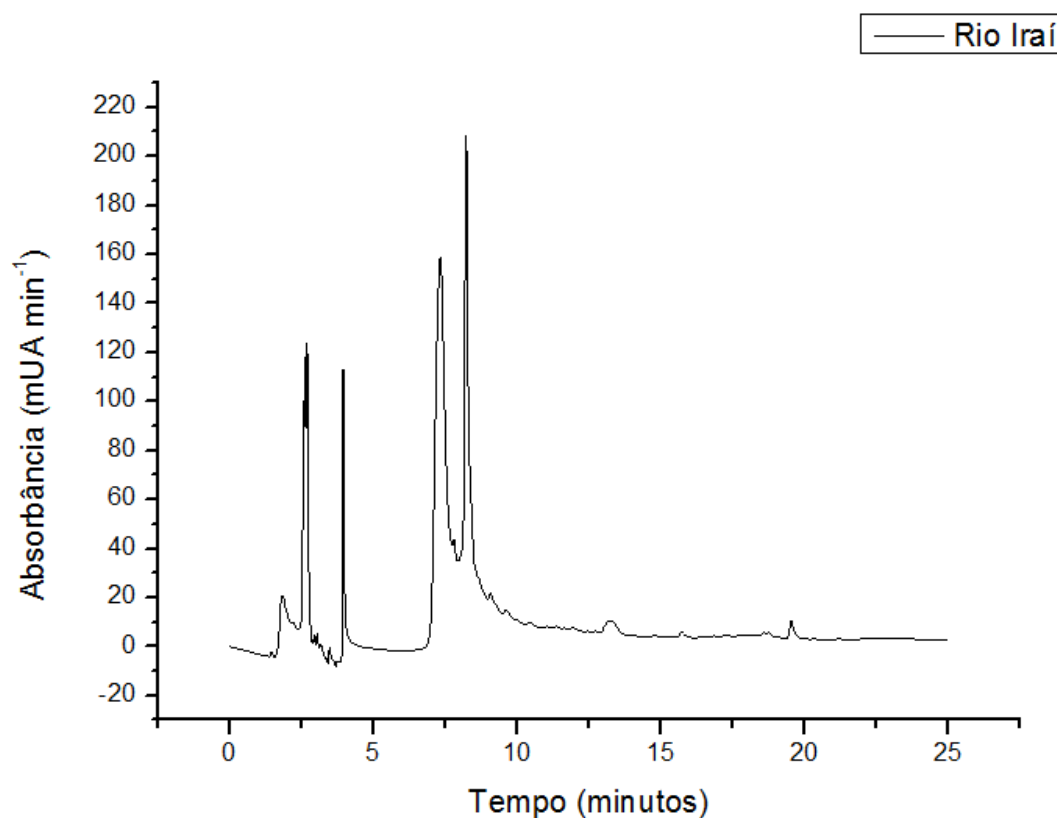


Figura 40: Cromatograma obtido para a amostra de água do rio Iraí, com extração em cartucho C18, com vazão de  $4\text{ mL min}^{-1}$  e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de  $1\text{ mL min}^{-1}$  em uma temperatura de  $26^\circ\text{C}$  em  $\lambda=240\text{ nm}$ .

Na amostra do rio Iraí não foi detectado nem quantificado nenhum dos analitos pelo fato dos analitos não estarem presentes, ou estarem em concentrações abaixo dos limites de detecção de cada um deles.

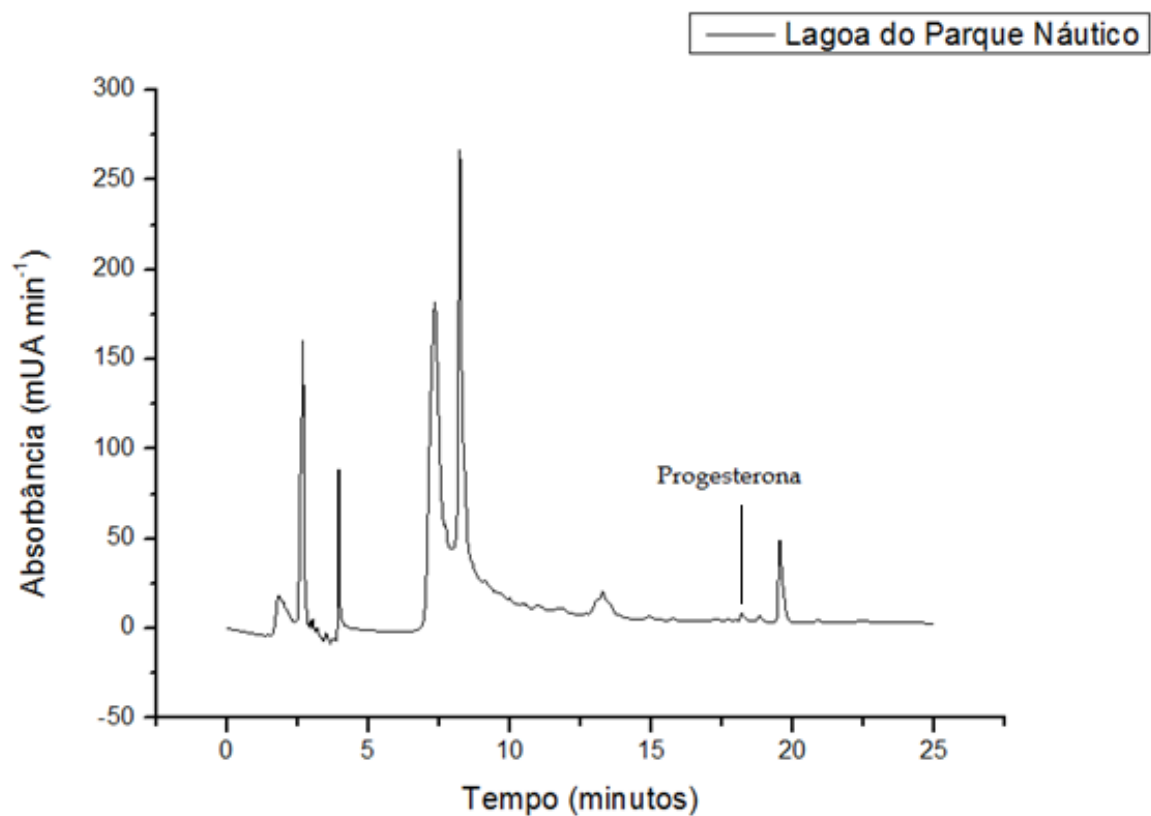


Figura 41 Cromatograma obtido para a amostra de água da lagoa do Parque Náutico, com extração em cartucho C18, com vazão de  $4\text{ mL min}^{-1}$  e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel Acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de  $1\text{ mL min}^{-1}$  em uma temperatura de  $26^\circ\text{C}$  em  $\lambda=240\text{ nm}$ .

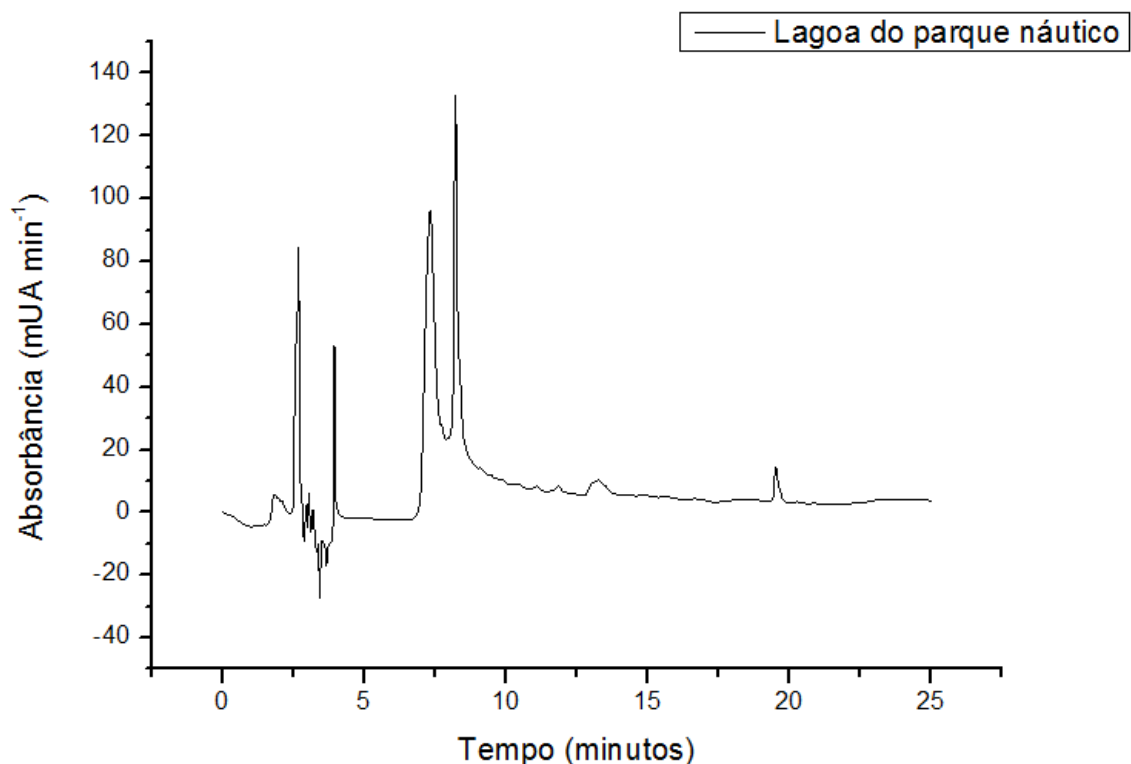


Figura 42: Cromatograma obtido para a amostra de água da lagoa do Parque Náutico, com extração em cartucho C18, com vazão de 4mL min<sup>-1</sup> e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel Acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup> em uma temperatura de 26° C em  $\lambda=272$  nm.

Na amostra da lagoa do Parque Náutico, o pico do único analito encontrado foi a progesterona, com uma concentração de 123 ng L<sup>-1</sup>. Na figura 42, o pico correspondente à cafeína não foi detectado.

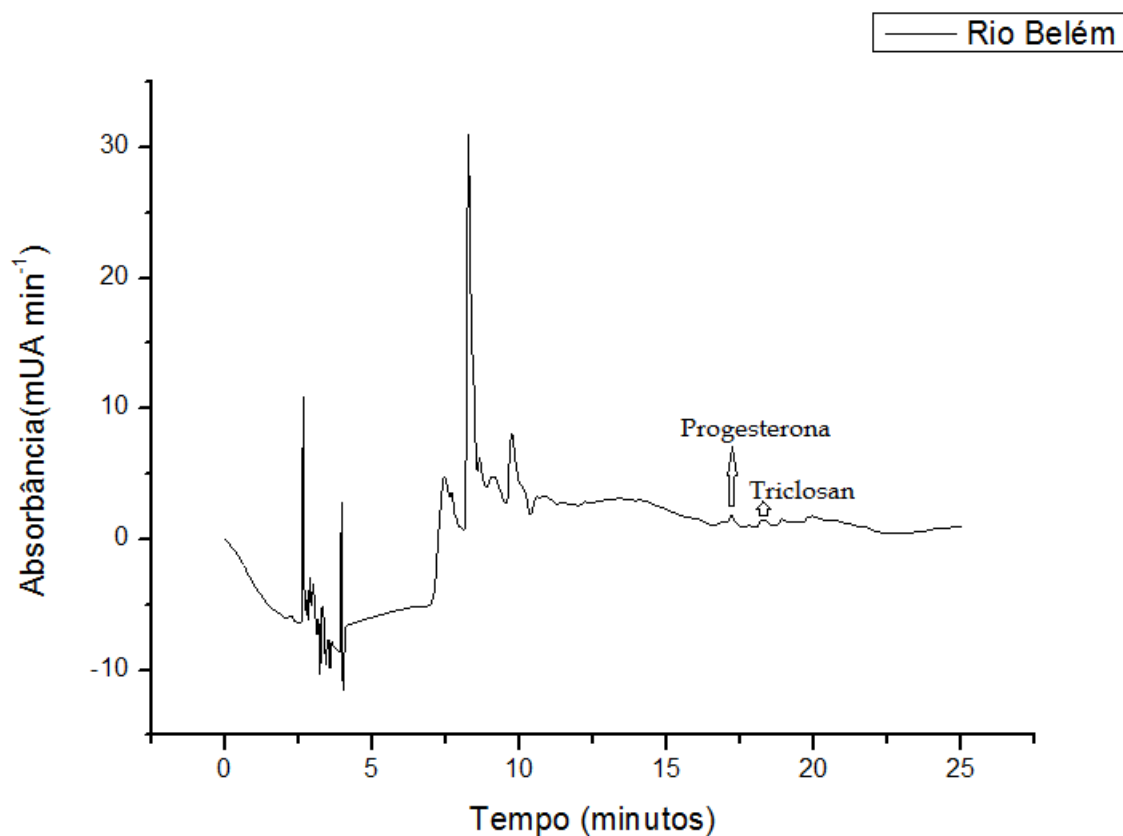


Figura 43: Cromatograma obtido para a amostra de água do rio Belém, com extração em cartucho C18, com vazão de  $4\text{ mL min}^{-1}$  e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel Acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de  $1\text{ mL min}^{-1}$  em uma temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$  em  $\lambda=240\text{ nm}$

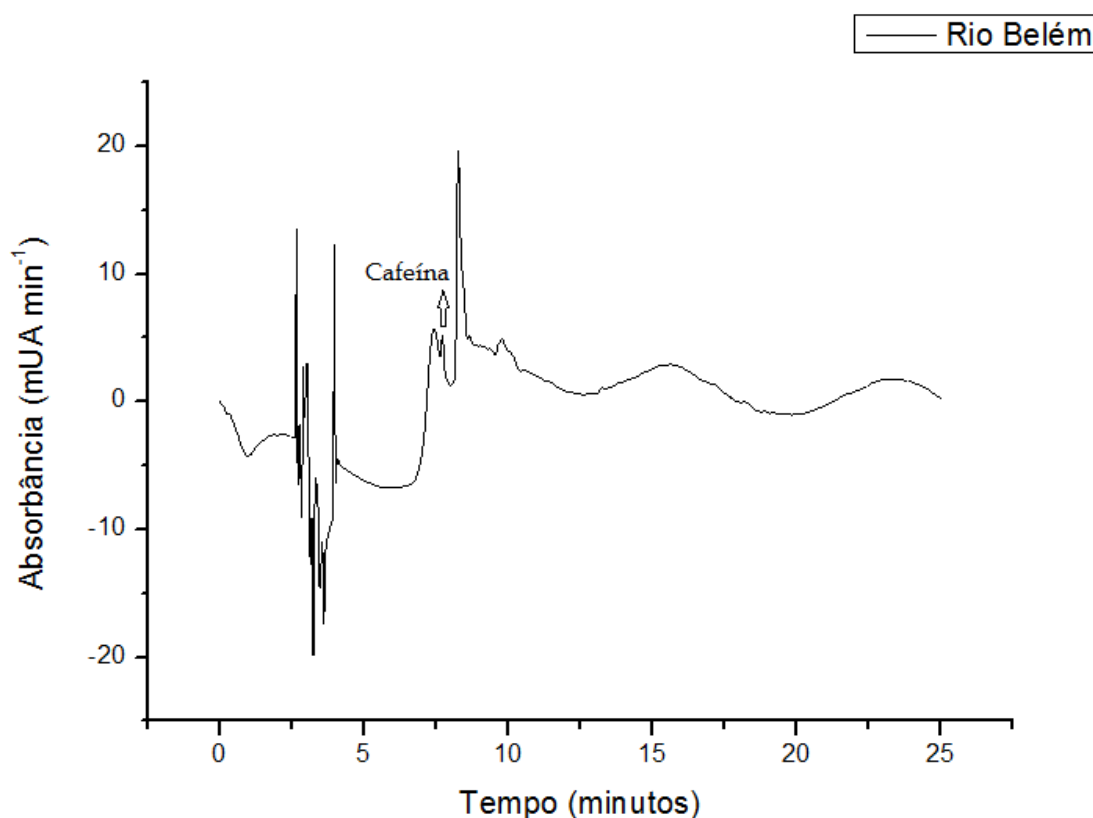


Figura 44: Cromatograma obtido para a amostra de água do rio Belém, com extração em cartucho C18, com vazão de 4mL min<sup>-1</sup> e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel Acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup> em uma temperatura de 26° C em  $\lambda=272$  nm

Na amostra do rio Belém foram encontrados 3, dos 4 analitos estudados: cafeína, progesterona e triclosan. As concentrações para todos os analitos ficaram acima do limite da curva analítica (225 ng L<sup>-1</sup>), portanto foi necessária a diluição da amostra, em 10 vezes. Após a análise das amostras, o valor obtido pelo equipamento foi multiplicado por 10, obtendo concentrações para a cafeína de 1730 ng L<sup>-1</sup>, para a progesterona de 850 ng L<sup>-1</sup> e para o triclosan de 900 ng L<sup>-1</sup>. A atrazina não foi detectada, pode não estar presente, ou estar em uma concentração abaixo do limite de detecção que é 7,93 ng L<sup>-1</sup>.

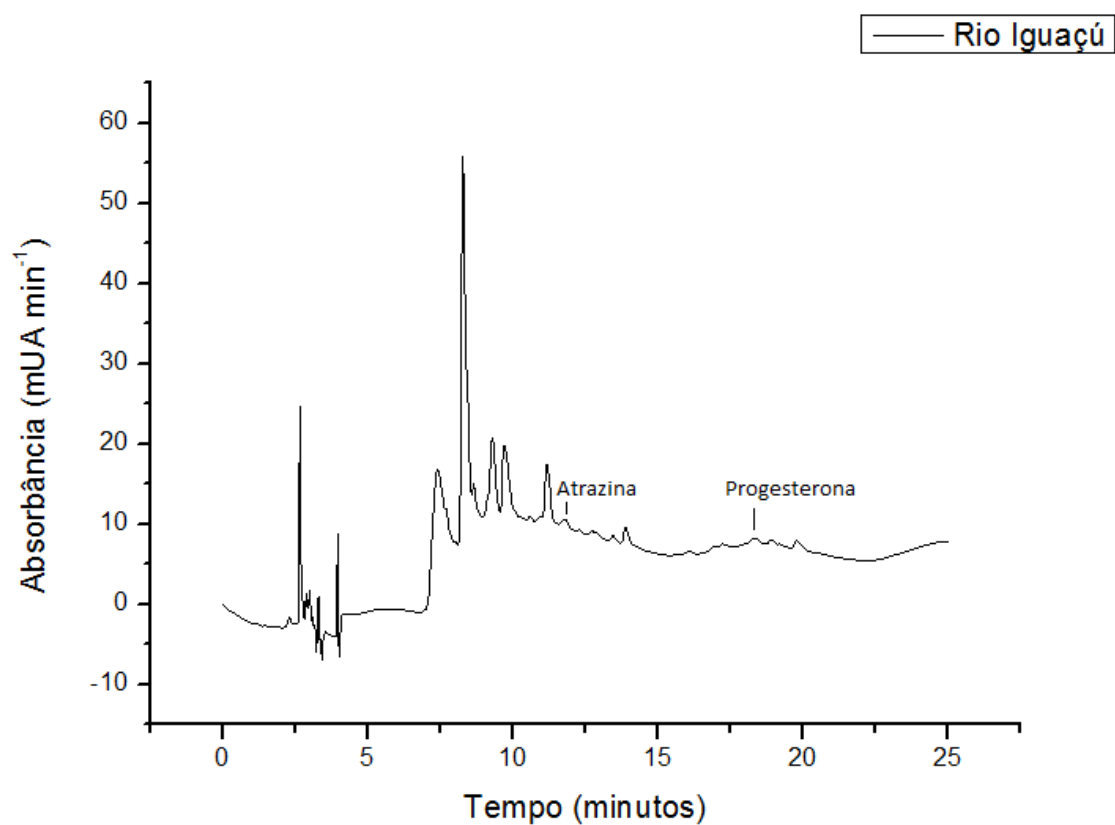


Figura 45: Cromatograma obtido para a amostra de água do rio Belém, com extração em cartucho C18, com vazão de  $4\text{ mL min}^{-1}$  e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel Acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de  $1\text{ mL min}^{-1}$  em uma temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$  em  $\lambda=240\text{ nm}$



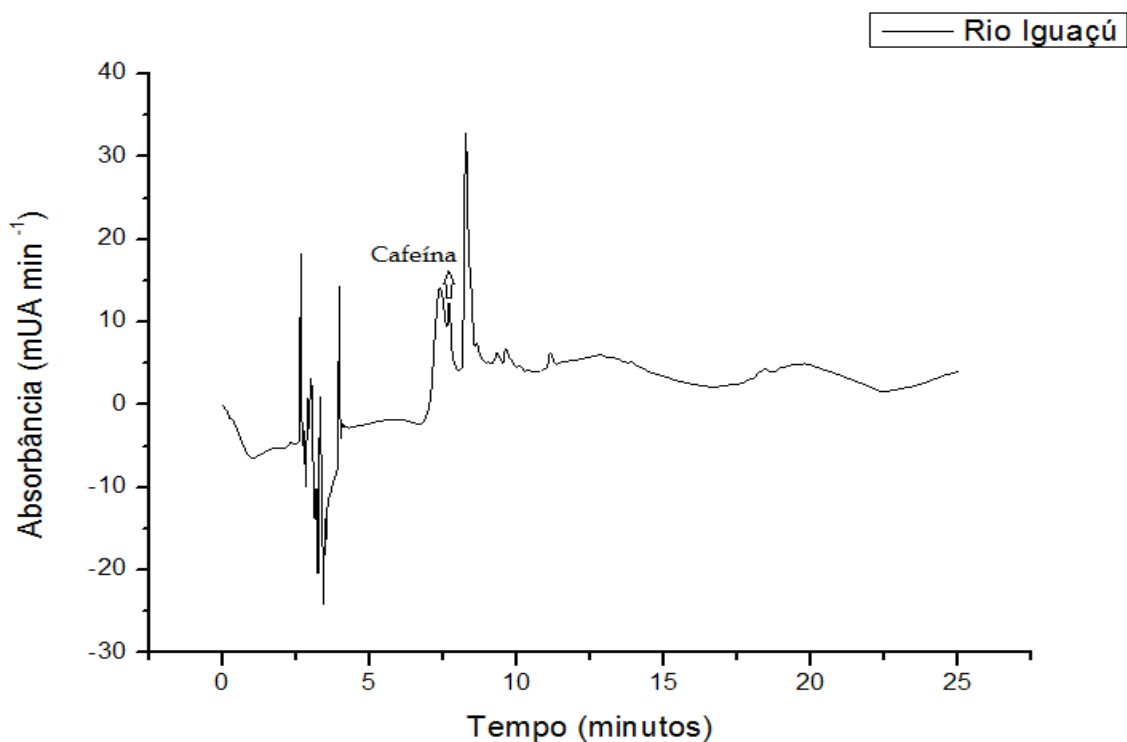


Figura 46: Cromatograma obtido para a amostra de água do rio Belém, com extração em cartucho C18, com vazão de  $4\text{ mL min}^{-1}$  e eluição com metanol. A análise foi feita em HPLC, com uma coluna C18, com fase móvel Acetonitrila/água, eluição por gradiente, vazão da fase móvel de  $1\text{ mL min}^{-1}$  em uma temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$  em  $\lambda=272\text{ nm}$

Na amostra do rio Iguaçu foram encontrados 3, dos 4 analitos estudados: atrazina, cafeína e progesterona. As concentrações para todos os analitos ficaram acima do limite da curva analítica ( $225\text{ ng L}^{-1}$ ), portanto foi necessária a diluição da amostra, em 10 vezes. Após a análise das amostras, o valor obtido pelo equipamento foi multiplicado por 10, obtendo concentrações para a atrazina de  $1020\text{ ng L}^{-1}$ , cafeína de  $2410\text{ ng L}^{-1}$  e para a progesterona de  $390\text{ ng L}^{-1}$ . O triclosan não foi detectado, pode não estar presente, ou estar em uma concentração abaixo do limite de detecção que é  $7,18\text{ ng L}^{-1}$ .

Na tabela 13, estão representados os resultados das análises das amostras:

Tabela 13: Resultados das análises das amostras

	Abastecimento público	Rio Iraí	Lagoa Parque Náutico (ng L <sup>-1</sup> )	Rio Belém (ng L <sup>-1</sup> )	Rio Iguaçu (ng L <sup>-1</sup> )
Atrazina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1020
Cafeína	< LOD	< LOD	< LOD	1730	2410
Progesterona	< LOD	< LOD	123± 0,029	850±0,032	390±0,041
Triclosan	< LOD	< LOD	< LOD	900±0,056	< LOD

Os limites de detecção de cada um dos analitos estão representados na tabela 11, sendo os valores:

Atrazina: 7,93 ng L<sup>-1</sup>

Cafeína: 17,7 ng L<sup>-1</sup>

Progesterona: 10,5 ng L<sup>-1</sup>

Triclosan: 7,18 ng L<sup>-1</sup>

## 5. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida para análise dos quatro compostos de interesse (atrazina, cafeína, progesterona e triclosan) foi satisfatória, visto que foi possível a detecção, quantificação e a construção de uma curva analítica com índice de determinação satisfatório, o que confere à curva uma linearidade na faixa de concentração analisada, além dos outros parâmetros (erro relativo e coeficiente de variação) também ficarem dentro dos limites estabelecidos. Desta forma, essa metodologia pode ser utilizada para futuros estudos de contaminantes emergentes em águas naturais.

Os limites de detecção e quantificação da atrazina ficaram bem próximos da literatura, o que confere maior confiabilidade ao método.

Os testes de extração em fase sólida mostraram que para três, dos quatro compostos de interesse, o cartucho com fase de octadecilsilano (C18) foi mais satisfatório que o cartucho com fase polimerizada (HLB-Oasis). Somente para o composto triclosan o cartucho com fase C18 não teve um bom valor de recuperação.

Foi possível detectar e quantificar os analitos nas amostras, verificando que o hormônio feminino (progesterona) foi o analito com maior frequência.

A cafeína foi o analito encontrado em maiores concentrações, já que a cafeína é um indicador de contaminação da água por esgoto e um indicador de estrogenicidade, os rios Belém e Iguaçu encontram-se contaminados com esgoto, devendo ter outros contaminantes emergentes em baixas concentrações.

No rio Belém e no rio Iguaçu foram encontrados três contaminantes. Esse fato mostra que a poluição ambiental em algumas áreas é preocupante, portanto, é necessário que hajam estudos cada vez mais frequentes para avaliar os males que esses contaminantes podem causar.

O fato de ser encontrado contaminante no rio Belém, pode ser devido à localização próxima a residências e centro urbano, com isso, a contaminação é maior devido ao aporte de esgoto direto. O rio Iguaçu passa por diversos pontos das cidades de Curitiba e São José dos Pinhais, com isso o rio pode estar contaminado devido à falta de saneamento básico em alguns lugares, ao lixo jogado diretamente nos rios e a baixa eficiência do tratamento do esgoto para esse tipo de contaminante.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adgent, M. a., & Rogan, W. J. (2015). Triclosan and prescription antibiotic exposures and enterolactone production in adults. *Environmental Research*, 142, 66–71. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.017>
- Aguirre-Martínez, G. V., DelValls, A. T., & Laura Martín-Díaz, M. (2015). Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 142–154. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.036>
- Amadori, M. F., Cordeiro, G. A., Rebouças, C. C., Peralta-Zamora, P. G., Grassi, M. T., & Abate, G. (2013). Extraction method for the determination of atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in agricultural soil using factorial design. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(3), 483–491. <http://doi.org/10.5935/0103-5053.20130058>
- Azizullah, Khattak K.N. Muhammad, Richter Peter, H. D.-P. (2011). Water pollution in Pakistan and its impact on public health--a review. *Environment International*, 37(2), 479–97. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.007>
- Barchanska, H., Rusek, M., & Szatkowska, A. (2012). New procedures for simultaneous determination of mesotrione and atrazine in water and soil. Comparison of the degradation processes of mesotrione and atrazine. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(1), 321–34. <http://doi.org/10.1007/s10661-011-1970-5>
- Bollmann, Harry; Edwiges, T. (2008). Avaliação da qualidade das águas do Rio Belém, Curitiba-PR, com o emprego de indicadores quantitativos perceptivos. *Engenharia Sanitária E Ambiental*, 13(4).
- Borges, E., & Bottoli, Carla B; Collins, C. (2010). Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. *Quimica Nova*, 33(4), 945–953. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400033>
- Chen, C., Yang, S., Guo, Y., Sun, C., Gu, C., & Xu, B. (2009). Photolytic

- destruction of endocrine disruptor atrazine in aqueous solution under UV irradiation: products and pathways. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2-3), 675–84. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.050>
- Chen, C.-E., Zhang, H., & Jones, K. C. (2012). A novel passive water sampler for in situ sampling of antibiotics. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 14(6), 1523–30. <http://doi.org/10.1039/c2em30091e>
- Do, H. T., Lo, S., Chiueh, P., Anh, L., & Thi, P. (2012). Environmental Modelling & Software Design of sampling locations for mountainous river monitoring. *Environmental Modelling & Software*, 28, 62–70. <http://doi.org/10.1016/j.envsoft.2011.09.007>
- Fayad, P. B., Prévost, M., & Sauvé, S. (2013). On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta*, 115, 349–60. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.038>
- Gao, L., Yuan, T., Cheng, P., Bai, Q., Zhou, C., Ao, J., Zhang, H. (2015). Effects of triclosan and triclocarban on the growth inhibition, cell viability, genotoxicity and multixenobiotic resistance responses of *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, 139, 434–440. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.059>
- Ghiselli, Gislaine; Jardim, W. (2007). Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, 30(3), 695–706.
- González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., Rodil, R., González-Peñas, J., & Cela, R. (2009). Comparison of molecularly imprinted, mixed-mode and hydrophilic balance sorbents performance in the solid-phase extraction of amphetamine drugs from wastewater samples for liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination. *Journal of Chromatography. A*, 1216(48), 8435–41. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.069>
- González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., Schrader, S., & Moeder, M. (2011). Fully automated determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in wastewater by microextraction by packed sorbents and gas

- chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 684(1-2), 50–7. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.049>
- Grazieli, C., & Collins, C. H. (2011). Revisão. *Química Nova*, 34(4), 665–676.
- Han, J., Qiu, W., & Gao, W. (2010). Adsorption of estrone in microfiltration membrane filters. *Chemical Engineering Journal*, 165(3), 819–826. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2010.10.024>
- Heidary, T., Radmehr, M., Khajavi, F., & Mahjub, R. (2015). European Journal of Pharmaceutical Sciences Application of chemometrics in determination of the acid dissociation constants (  $pK_a$  ) of several benzodiazepine derivatives as poorly soluble drugs in the presence of ionic surfactants. *European journal of pharmaceutical sciences*, 69, 44–50. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.12.013>
- Hijosa-Valsero, M., Bécares, E., Fernández-Aláez, C., Fernández-Aláez, M., Mayo, R., & Jiménez, J. J. (2016). Chemical pollution in inland shallow lakes in the Mediterranean region (NW Spain): PAHs, insecticides and herbicides in water and sediments. *Science of the Total Environment*, 544, 797–810. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.160>
- Hurtado-sánchez, C., Lozano, V. A., Rodríguez-, M. I., Durán-merás, I., & Escandar, G. M. (2015). Talanta Green analytical determination of emerging pollutants in environmental waters using excitation – emission photoinduced fluorescence data and multivariate calibration. *Talanta*, 134, 215–223. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.022>
- Hwang, I., Kwak, H., & Park, S. (2010). Journal of Industrial and Engineering Chemistry Determination and prediction of  $K_{ow}$  and dimensionless Henry's constant (  $H$  ) for 6 ether compounds at several temperatures. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16(4), 629–633. <http://doi.org/10.1016/j.jiec.2010.03.003>
- Jin, W., Huang, B., Wang, B., Wang, D.-W., Zhao, S.-M., & Pan, X.-J. (2013). Simultaneous Determination of Androgens and Progestogen in Surface Water and Sediment by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 41(2), 205–209.

[http://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60628-3](http://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60628-3)

- Joss, A. et al. (2010). Sampling for Pharmaceuticals and Personal Care Products ( PPCPs ) and Illicit Drugs in Wastewater Systems : Are Your Conclusions Valid ? A Critical Review. *Environmental Science & Technology*, 44(16), 6024–6035.
- Kasicka, R. K. J. D. V. (2015). Determination of acid dissociation constants of triazole fungicides by pressure assisted capillary electrophoresis Renáta Konáť. *Journal of Chromatography A*, 1408, 243–249.  
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.005>
- Kibena, J., Nhapi, I., & Gumindoga, W. (2013). Assessing the relationship between water quality parameters and changes in landuse patterns in the Upper Manyame River, Zimbabwe. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*. <http://doi.org/10.1016/j.pce.2013.09.017>
- Kookana, R. S., Shareef, A., Fernandes, M. B., Hoare, S., Gaylard, S., & Kumar, A. (2013). Bioconcentration of triclosan and methyl-triclosan in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) under laboratory conditions and in metropolitan waters of Gulf St Vincent, South Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), 66–72. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.030>
- Lee, B., & Lin, S. (2014). Fluid Phase Equilibria A priori prediction of the octanol – water partition coefficient (  $K_{ow}$  ) of ionic liquids. *Fluid Phase Equilibria*, 363, 233–238. <http://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.11.042>
- Lei, L., Kang, M. Q., Li, N., Yang, X., Liu, Z. L., Wang, Z. B., ... Yu, Y. (2014). Determination of sex hormones in cosmetic products by magnetically stirring extraction bar liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 6(11), 3674. <http://doi.org/10.1039/c4ay00007b>
- Lin, W., Chen, H., & Ding, W. (2005). Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography – mass spectrometry, 1065, 279–285.  
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.081>
- Liz, M. V. De, & Nagata, Noemi, Z. P. (2012). Considerações sobre o preparo



- de amostras contendo micropoluentes estrogênicos. *Química Nova*, 35(6), 1213–1215.
- Loos, R., Tavazzi, S., Paracchini, B., Canuti, E., & Weissteiner, C. (2013). Analysis of polar organic contaminants in surface water of the northern Adriatic Sea by solid-phase extraction followed by ultrahigh-pressure liquid chromatography-QTRAP® MS using a hybrid triple-quadrupole linear ion trap instrument. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(18), 5875–85. <http://doi.org/10.1007/s00216-013-6944-8>
- Luo, N., Xu, R., Yang, M., Yuan, X., Zhong, H., & Fan, Y. (2015). Preparation and characterization of PVDF-glass fiber composite membrane reinforced by interfacial UV-grafting copolymerization. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 38, 24–35. <http://doi.org/10.1016/j.jes.2015.04.027>
- Maia, D., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, 30(3), 651–666.
- Maldaner, L., & Jardim, I. C. S. F. (2012). Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 100, 38–44. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.006>
- Marchetti, G., Minella, M., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., Chimica, D., & Giuria, V. P. (2013). Photochemical transformation of atrazine and formation of photointermediates under conditions relevant to sunlit surface waters : Laboratory measures and modelling. *Water Research*, 7(47), 6211– 6222.
- Molyneux, P. (2014). Fluid Phase Equilibria Octanol / water partition coefficients  $K_{ow}$  : A critical examination of the value of the methylene group contribution to log  $K_{ow}$  for homologous series of organic compounds. *Fluid Phase Equilibria*, 368, 120–141. <http://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.01.014>
- Montagner, C. C., & Jardim, W. F. (2011). Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Brasilian of Chemical Society*, 22(8), 1452–1462.
- Naidu, R., Andres, V., Espana, A., Liu, Y., & Jit, J. (2016). Emerging

- contaminants in the environment : Risk-based analysis for better management. *Chemosphere*, 154, 350–357.
- Peng, F.-Q., Ying, G.-G., Yang, B., Liu, S., Lai, H.-J., Liu, Y.-S., ... Zhou, G.-J. (2014). Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): transformation kinetics and products identification. *Chemosphere*, 95, 581–8. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.013>
- Peysson, W., & Vulliet, E. (2013). Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick , easy , cheap , effective , rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography – time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1290, 46–61. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057>
- Pintado-Herrera, M. G., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. a. (2014). Determining the distribution of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings. *Chemosphere*, 95, 478–85. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.101>
- Robles-molina, J., Lara-ortega, F. J., Gilbert-lópez, B., García-reyes, J. F., & Molina-díaz, A. (2014). Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1350, 30–43.
- Rodríguez-González, N., González-Castro, M. J., Beceiro-González, E., Muniategui-Lorenzo, S., & Prada-Rodríguez, D. (2014). Determination of triazine herbicides in seaweeds: development of a sample preparation method based on Matrix Solid Phase Dispersion and Solid Phase Extraction Clean-up. *Talanta*, 121, 194–8. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.063>
- S, N. A. J. (2009). Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*, 1, 69–77.
- Sannino, F., Iorio, M., De Martino, A., Pucci, M., Brown, C. D., & Capasso, R. (2008). Remediation of waters contaminated with ionic herbicides by

- sorption on polymerin. *Water Research*, 42(3), 643–652.  
<http://doi.org/10.1016/j.watres.2007.08.015>
- Silva, B.J.G. Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica. 2007.  
 Dissertação de mestrado- Ribeirão Preto- SP.
- Sodré, F. F., Antonio, M., Locatelli, F., & Jardim, W. F. (2010). Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. *Química Nova*, 33(1), 216–219.
- Švorc, L., Rievaj, M., & Bustin, D. (2013). Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: Determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 294–300. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2013.02.036>
- Talio, M. C., Alesso, M., Acosta, M., Gimena, M., Luconi, M. O., & Fernández, L. P. (2013). Clinica Chimica Acta Caffeine monitoring in biological fluids by solid surface fluorescence using membranes modified with nanotubes, 425, 42–47.
- Valderrama, P; Braga, J. W. B; Poppi, R. . (2008). State of the art of figures of merit in multivariate calibration. *Química Nova*, 32(December), 1278–1287.
- Wang, C.-F., & Tian, Y. (2015). Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental Pollution*, 206, 195–201.  
<http://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.001>
- Wang, Y., Wilson, J. M., & Vanbriesen, J. M. (2015). The effect of sampling strategies on assessment of water quality criteria attainment. *Journal of Environmental Management*, 154, 33–39.
- Xu, X., Liang, F., Shi, J., Zhao, X., Liu, Z., Wu, L., ... Wang, Z. (2013). Determination of hormones in milk by hollow fiber-based stirring extraction bar liquid-liquid microextraction gas chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 790, 39–46.  
<http://doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.035>

Zou, Y., Chen, Y., Yan, Z., Chen, C., Wang, J., & Yao, S. (2013). Magnetic solid-phase extraction based on tetrabenzyl modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for the analysis of trace polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *The Analyst*, 138(20), 5904–12.  
<http://doi.org/10.1039/c3an01027a>